

RICARDO LEMOS

ANÁLISE DA BACTERIBILIA EM PACIENTES SUBMETIDOS A
COLECISTECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA MEDIANTE CULTURA
AUTOMATIZADA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo F. Matias

CURITIBA
2008

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Lemos, Ricardo

L557a Análise de bacteribilia em pacientes submetidos a colecistectomia videolaparoscópica mediante cultura automatizada e reação em cadeia da polimerase. / Ricardo Lemos ; orient. Dr. Antonio Carlos L. Campos. - Curitiba : UFPR , 2008.

121 f. ; il. ; 30 cm.

Orientador: Antonio Carlos L. Campos.
Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná

1. Bacteribilia. 2. Colecistectomia videolaparoscópica.
I. orient. Campos, Antonio Carlos L. II. Título

CDD 616.075

Aos meus pais, Ademar e Nanci, que do seu amor, hoje aqui me faço presente. Amo vocês.

À Cynthia, minha mulher e aos meus filhos Guilherme e Gustavo, a quem tudo devo, tudo faço e a tudo direciono o meu esforço e o meu amor. Amo muito vocês.

Aos meus avós, Edegard (“*in memoriam*”) e Paula, meus grandes amigos.

À dona Beni, minha sogra, diga-se de passagem, a melhor do mundo, muito obrigado pela ajuda em todos os sentidos e também pela filha.

Ao senhor André, meu sogro, exemplo de organização e ordem. Muito obrigado.

As minhas irmãs, cunhado e sobrinha, Denise, Lenir, Marina, Ian e Rafinha, muito obrigado por existirem.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Doutor Carlos Ligocki Campos, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná e Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio constante, “pela pressão” e pelos valiosos e criteriosos conselhos para a finalização deste projeto, meu muito obrigado.

Ao Professor e Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Professor Adjunto de Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade do Paraná, pela ajuda e apoio na conclusão desta tese.

Ao Professor e Doutor Mauro de Souza L'eita Pinho, Professor da Disciplina de Anatomia e da Disciplina de Clínica Cirúrgica da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Preceptor da Residência Médica em Cirurgia Geral e Coloproctologia do Hospital Municipal São José, Joinville – SC, mais que professor, mais que colega de trabalho, mais que um incentivador do academicismo, um verdadeiro amigo (“saudações rubro-negras”). Muito obrigado.

Aos Doutores Franco Haritsch, Marco Antônio Navarro, Christian Evangelista Garcia, Jorge Y. Murata, Mariolivo Mognol, sócios, amigos, companheiros e grandes fornecedores da matéria-prima para a realização deste trabalho científico, obrigado pela força.

Aos Doutores Luís Carlos Ferreira e Milton Correia, Médicos Preceptores do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José e Centro Hospitalar Unimed – CHU, parceiros de quilômetros rodados na rodovia Joinville-Curitiba, para acompanhar os créditos da Pós-Graduação, obrigado pela amizade e pelo auxílio da confecção deste trabalho.

Ao Doutor Sérgio José Ferreira, Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José e Doutores Aluisio Stoll e Rafael Selbach, Médicos Preceptores do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Municipal São José e Centro Hospitalar Unimed – CHU, pela ajuda, apoio e auxílio na coleta de dados.

Ao Professor e Doutor Paulo Henrique Condeixa de França, Professor da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, pelos ensinamentos e dicas sobre a difícil cadeira de Biologia Molecular.

A Bióloga Leslie Ecker Ferreira, Pesquisadora da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, pela incrível paciência, disposição e ajuda para o entendimento e realização dos estudos sobre Biologia Molecular.

Aos Biquímicos Sandra Ganske, Amanda Nunes, Ângela dos Reis Madeira, Osmar Pereira Junior e a Técnica em Bioquímica Jaqueline Schimits, pelo auxílio, atenção, disposição e mais uma vez, paciência na realização de uma das etapas deste trabalho.

Ao Médico Residente Doutor Guilherme Pintarelli, Residente em Cirurgia Geral no Hospital Municipal São José, Joinville – SC, pelo auxílio na parte gráfica deste trabalho.

Ao Médico Residente Doutor Antônio José Garcia Pereira, Residente em Cirurgia Geral no Hospital Municipal São José, Joinville – SC e sua mulher Sra. Amila Čirgič Pereira, pelo auxílio nas traduções deste trabalho.

À Direção do Centro Hospitalar Unimed – CHU de Joinville - SC, em nome dos Doutores Altair Carlos Pereira Celso Boettcher e Enio Rieger, pelo apoio para a realização dos procedimentos cirúrgicos e utilização das dependências do Laboratório de Análises Clínicas do CHU.

À Universidade Federal do Paraná, pela receptividade e oportunidade de frequentar o Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde.

À Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, pela oportunidade de permitir meu acesso à docência e a utilizar seus laboratórios no desenvolvimento desta pesquisa.

À Senhora Karyn M. Lehmkuhl, Bibliotecária da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, pela grande ajuda na obtenção dos artigos pelo COMUT.

Aos Professores Ary Elias Sabbag Junior e Márcia Olandoski, mestres em Estatística, pelo auxílio e entendimento do trabalho estatístico realizado.

Aos funcionários do Centro Cirúrgico do Centro Hospitalar Unimed – CHU, Enfermeira-Chefe Desirré Ramos da Silva e das Técnicas de Enfermagem Ivonete Menezes Froelich e Cristiane Nazário do Grupo de Liderança, pelo incansável auxílio durante a realização dos procedimentos cirúrgicos além da coleta de material.

À Senhora Regina Aparecida Sass Marques, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela paciência e ajuda durante toda a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo incentivo à pesquisa e desenvolvimento científico, além da bolsa de estudo.

À todas as pessoas e colegas que direta ou indiretamente participaram deste projeto e finalmente aos meus grandes, melhores e eternos amigos desta vida terrena e da outra além do Horizonte: Doutores Franco Haritsch, Luiz Fernando Córdova de la Quintana, Allan Cezer Faria de Araújo, Wagner Marcolin Trautwein, Marcelo Augusto Capraro e Cleber Augusto Gonçalves, que a distância não quebre este encanto. Obrigado.

Saber não é conhecer. O saber é o instrumento que nos leva ao conhecer das coisas. A fé é apenas o saber que se aceitou sem conhecer. Os símbolos são instrumentos que resumem o saber e facilitam o acesso ao conhecer. Do saber ao conhecer se chega pela razão.

Ambroise Peters

RESUMO

INTRODUÇÃO: Embora considerada como inexistente na bile normal, existem controvérsias a respeito da presença de bacteribilia em pacientes portadores de colelitíase, existindo relatos que variam de 0 a 73% de culturas positivas. Com os avanços decorrentes dos estudos de biologia molecular podemos agora avaliar a presença de bactérias através da pesquisa do seu DNA utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR.

OBJETIVOS: Determinar a incidência de bacteribilia mediante detecção de DNA bacteriano e de culturas automatizadas de pacientes submetidos a colecistectomia videolaparoscópica para tratamento da colelitíase sintomática; determinar se os resultados de positividade em culturas representam a real incidência de bacteribilia e correlacionar os resultados com a idade, diagnóstico anatomo patológico e tempo cirúrgico.

PACIENTES e MÉTODOS: Foram analisadas amostras resultantes de 84 colecistectomias videolaparoscópicas através de PCR e cultura automatizada, em pacientes com idade média de 47,1 anos e de ambos os sexos (65 F : 19 M).

RESULTADOS: Foi observada positividade de 42 casos (50%) pela técnica de PCR e 16 casos (19%) nas análises pela cultura automatizada ($p < 0,001$). Dos 84 pacientes avaliados, observou-se a concordância entre as duas técnicas em 44 amostras (52,38%). A anatomia-patológica demonstrou 82,2% dos casos com colecistite crônica calculosa e 17,8% de colecistite crônica calculosa agudizada, observando-se diferença significativa na incidência de bacteribilia entre estes dois grupos apenas nas culturas automatizadas ($p = 0,033$). A presença de bactérias na bile também só foi significativamente maior entre pacientes com idade superior a 60 anos quando comparados àqueles abaixo desta idade nas análises através de culturas automatizadas ($p = 0,018$). Não houve significância entre os resultados da cultura e do PCR em relação ao tempo cirúrgico.

CONCLUSÕES: 1) A incidência de bacteribilia observada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é superior àquela evidenciada mediante a cultura automatizada; 2) A real incidência de bacteribilia em pacientes portadores de colecistopatia crônica mediante cultura automatizada pode ser superior àquela sugerida na literatura atual; 3) A incidência de bacteribilia em pacientes acima de 60 anos através da cultura automatizada é significativamente superior do que aquela encontrada em pacientes abaixo desta idade; 4) A incidência de bacteribilia é significativamente superior mediante a cultura automatizada nos casos agudizados quando comparada aos casos não agudizados e 4) A incidência de bacteribilia mediante cultura automatizada e pela técnica de PCR quando analisados os tempos operatórios acima e abaixo de 60 minutos, não demonstra diferença significativa.

Palavras-chave: Bacteribilia. Colecistectomia. Reação em cadeia da polimerase - PCR.

ABSTRACT

Analysis of Bacteribilia in Videolaparoscopic Cholecystectomy Patients by Culture and Polymerase Chain Reaction - PCR

BACKGROUND: The incidence of bacteribilia in cholelithiasis remains subject of controversy with reports of positive cultures varying from 0 to 73%. Recent advances in molecular biology has contributed for detection of bacterial DNA by polymerase chain reaction (PCR) technique.

OBJECTIVES – To determine the presence of bacteria by both automated cultures and PCR methods in bile extracted from gallblader specimens in patients who underwent a cholecystectomy for treatment of symptomatic colelithiasis. To determine if positive cultures results express the real incidence of bacteribilia and to correlate our findings with age, pathology diagnosis and length of operation.

PATIENTS AND METHODS: Bile samples from 84 laparoscopic cholecystectomies were analized by both automated cultures and PCR technique. Mean age was 47,1 y.o. and gender rate was 64 F: 19 M.

RESULTS: Positive results for bacteribilia was found in 42 cases (50%) by PCR method and 16 cases (19%) by automated culture ($p<0.001$). Agreement of results by both methods was observed in 44 samples (52,3%). Pathology diagnosis showed the presence of chronic cholecistitis in 82,2% and acute cholecistitis in 17,8% and bacteribilia incidence related to this diagnosis was significantly different only by culture assessment ($p=0.033$). Significant difference related to age above 60 y.o. was also found only in automated culture results ($p=0.018$). No significant difference was found by both methods regarding the length of operation.

CONCLUSIONS: 1) The incidence of bacteribilia observed by PCR method is superior to culture results. 2) Real incidence of bacteribilia may be higher than suggested by literature. 3) Incidence of bacteribilia in patients older than 60 y.o. is superior by culture method. 4) Incidence of bacteribilia in cholecistitis by culture is significantly higher in acute than chronic cases. 5) No significant difference was found by both methods regarding the length of operation.

Key Words: Bactibilia. Cholecystectomy. Polimerase Chain Reaction - PCR.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 | - ESTRUTURA DO DNA | 39 |
| FIGURA 2 | - COLETA DE BILE | 50 |
| FIGURA 3 | - FRASCO DE CULTURA DE BILE BacT/ALERT® SA | 51 |
| FIGURA 4 | - CULTURA DE BILE | 52 |
| FIGURA 5 | - INCUBAÇÃO DOS FRASCOS DE CULTURA DE BILE | 52 |
| FIGURA 6 | - FRASCOS DE CULTURA COM AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS..... | 53 |
| FIGURA 7 | - SEMEADURA NOS MEIOS DE CULTURA AGAR SANGUE DE CARNEIRO E AGAR MACCONKEY PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS | 54 |
| FIGURA 8 | - TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA FENOL-CLOROFÓRMIO | 55 |
| FIGURA 9 | - AGITADOR VÓRTEX GENIE 2 | 55 |
| FIGURA 10 | - MICROCENTRÍFUGA CENTRIFUGE® 5415 - EPPENDORF | 56 |
| FIGURA 11 | - PRECIPITADO DE DNA GENÔMICO DOS TUBOS DE EPPENDORF | 57 |
| FIGURA 12 | - TERMOCICLADOR PTC - 100 | 57 |
| FIGURA 13 | - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES | 58 |
| FIGURA 14 | - PLATINUM TAQ DNA POLIMERASE, SOLUÇÃO TAMPÃO E MgCl ₂ | 59 |
| FIGURA 15 | - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | 60 |
| FIGURA 16 | - ELETROFORESE | 61 |
| FIGURA 17 | - CUBA DE ELETROFORESE | 61 |
| FIGURA 18 | - <i>AMPLICON</i> S CORADOS COM AZUL DE BROMOFEROL E DEPOSITADOS NOS <i>SLOTS</i> DO GEL DE AGAROSE | 62 |
| FIGURA 19 | - AMPLIFICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA NO GEL PARA MIGRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE DNA DO PÓLO NEGATIVO PARA O PÓLO POSITIVO | 62 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 20 | - GEL DE AGAROSE | 63 |
| FIGURA 21 | - SISTEMA DE FOTO DOCUMENTAÇÃO (BIO - IMAGING SYSTEMS, MINI BIS PRO) | 63 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1 - SIMULAÇÃO DE AMPLIFICAÇÕES PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | 60 |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 | - PESQUISA DE DNA BACTERIANO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | 68 |
| TABELA 2 | - RESULTADO DAS AMOSTRAS EM ESTUDO | 69 |
| TABELA 3 | - RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA | 70 |
| TABELA 4 | - RELAÇÃO ENTRE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR VS CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE NA COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA AGUDIZADA | 71 |
| TABELA 5 | - RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA VS CULTURA AUTOMATIZADA | 72 |
| TABELA 6 | - RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | 73 |
| TABELA 7 | - RELAÇÃO ENTRE O TEMPO OPERATÓRIO VS CULTURA AUTOMATIZADA | 75 |
| TABELA 8 | - RELAÇÃO ENTRE O TEMPO OPERATÓRIO VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | 75 |
| TABELA 9 | - POSITIVIDADE DE CULTURAS DE BILE EM COLECISTOPATIA CRÔNICA | 80 |
| TABELA 10 | - HISTÓRICO DE ESTUDOS SOBRE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS NA BILE HUMANA | 82 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | | |
|-----------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| GRÁFICO 1 | - | NÚMERO DE PACIENTES POR FAIXA ETÁRIA | 66 |
| GRÁFICO 2 | - | CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE | 68 |
| GRÁFICO 3 | - | ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CULTURA DE BILE E A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE | 70 |
| GRÁFICO 4 | - | RELAÇÃO ENTRE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR VS CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE NA COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA | 72 |
| GRÁFICO 5 | - | RELAÇÃO ENTRE A IDADE VS CULTURA AUTOMATIZADA | 74 |
| GRÁFICO 6 | - | RELAÇÃO ENTRE A IDADE VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| A | Adenina |
| bp | pares de bases |
| C | Citosina |
| CAC | Colecistite Aguda calculosa |
| CCC | Colecistite Crônica Calculosa |
| CDC | US Center for Diseases Control and Prevention |
| cels | células |
| CEP | Comissão de Ética em Pesquisa |
| CHU | Centro Hospitalar Unimed |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standarts Institute |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| dNTP's | desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic Acid |
| etc | et caetera (= e outros) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| G | Guanina |
| g | grama |
| h(s) | hora (s) |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| H ₂ O | Água |
| K | Potássio |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| Kg | Kilograma |
| M | Molar |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| mg | miligrama |
| ml | mililitro |
| mM | miliMolar |
| mm | milímetro |
| mm ³ | milímetro cúbico |
| µg | micrograma |
| µl | microlitro |
| µM | micromolar |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NTSC | National Television System(s) Committee |
| Obs | Observação |
| p | nível de significância |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| pmoles | picomoles |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| rDNA | Ácido Desoxirribonucleico ribossomal |
| rRNA | Ácido Ribonucléico ribossomal |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RNA _m | Ácido Ribonucléico mensageiro |
| RNA _t | Ácido Ribonucléico transportador |

| | |
|----------|----------------------------------------|
| rpm | rotações por minuto |
| SA | Standard Aerobic |
| SAJ | Serviço de Anestesiologia de Joinville |
| SC | Santa Catarina |
| T | Timina |
| t | tempo |
| TBE | Tris/Borato/EDTA |
| TE | Tris EDTA |
| TM | Trade Mark (Marca Registrada) |
| Tris | Triethylammonium |
| TTV | TT vírus (Circoviridae viruses) |
| ufc | unidade formadora de colônia |
| UNIVILLE | Universidade da Região de Joinville |
| V | Voltz |
| v | volume |
| ® | Marca Registrada |
| % | por cento |
| > | maior |
| < | menor |
| = | igual |
| °C | graus Celsius |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 OBJETIVOS | 24 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 25 |
| 2.1 COLECISTECTOMIAS (CONVENCIONAL E VIDEOLAPAROSCÓPICA) | 25 |
| 2.2 BACTERIBILIA (ESTUDO POR CULTURA CONVENCIONAL E POR MÉTODOS AUTOMATIZADOS) | 26 |
| 2.2.1 Início do século XX | 27 |
| 2.2.2 Década de 20 | 27 |
| 2.2.3 Década de 30 | 28 |
| 2.2.4 Década de 40 | 28 |
| 2.2.5 Década de 50 | 29 |
| 2.2.6 Década de 60 | 30 |
| 2.2.7 Década de 70 | 30 |
| 2.2.8 Década de 80 | 32 |
| 2.2.9 Década de 90 | 35 |
| 2.2.10 Século XXI | 36 |
| 2.3 BIOLOGIA MOLECULAR | 37 |
| 2.4 DNA | 39 |
| 2.5 GENE 16S r RNA | 40 |
| 2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | 40 |
| 2.7 ESTUDO DO DNA BACTERIANO NA BILE POR PCR | 42 |
| 2.8 ELETROFORESE | 46 |
| 3 PACIENTES E MÉTODOS | 48 |
| 3.1 CASUÍSTICA | 48 |
| 3.2 PRÉ-OPERATÓRIO | 48 |
| 3.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO | 49 |
| 3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO | 49 |
| 3.5 COLETA DA BILE | 50 |
| 3.6 CULTURA DA BILE | 51 |
| 3.7 PESQUISA DO DNA BACTERIANO ATRAVÉS DE PCR | 54 |
| 3.7.1 Extração do DNA | 54 |
| 3.7.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR | 57 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.3 Eletroforese..... | 61 |
| 3.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA..... | 64 |
| 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 65 |
| 4 RESULTADOS | 66 |
| 4.1 IDADE..... | 66 |
| 4.2 SEXO..... | 67 |
| 4.3 TEMPO OPERATÓRIO..... | 67 |
| 4.4 COMPLICAÇÕES DA FERIDA OPERATÓRIA..... | 67 |
| 4.5 CULTURA AUTOMATIZADA DA BILE..... | 67 |
| 4.6 PESQUISA DO DNA BACTERIANO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR..... | 68 |
| 4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CULTURA vs REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR..... | 69 |
| 4.8 INFLUÊNCIA DO RESULTADO ANATOMIA PATOLÓGICA NA POSITIVIDADE DA CULTURA E DA PCR NA BILE..... | 70 |
| 4.9 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE PATOLOGIA E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS..... | 72 |
| 4.9.1 Análise dos resultados da anatomia patológica vs cultura automatizada..... | 72 |
| 4.9.2 Análise dos resultados da anatomia patológica vs reação em cadeia da polimerase - PCR..... | 73 |
| 4.10 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE IDADE E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS | 73 |
| 4.11 RELAÇÃO ENTRE TEMPO OPERATÓRIO E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS..... | 75 |
| 5 DISCUSSÃO | 76 |
| 5.1 IDADE | 76 |
| 5.2 TEMPO CIRÚRGICO | 77 |
| 5.3 COMPLICAÇÕES EM FERIDAS OPERATÓRIAS | 78 |
| 5.4 RESULTADOS DA CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE | 79 |
| 5.5 PESQUISA DE DNA BACTERIANO POR PCR | 83 |
| 5.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR vs CULTURA | 85 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.7 RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA E SUA RELAÇÃO AOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DA BACTERIBILIA E SUA POSITIVIDADE | 88 |
| 6 CONCLUSÕES | 90 |
| REFERÊNCIAS | 91 |
| APÊNDICES | 107 |
| ANEXO | 121 |

1 INTRODUÇÃO

Embora a litíase biliar tenha sido descrita, pela primeira vez, no século V pelo médico grego Alexander Trallianus, a terapia para a doença dos cálculos biliares foi iniciada somente em 1667, quando Stalper von der Weil mencionou a retirada de cálculos biliares ao abrir um abscesso da parede abdominal. Somente dois séculos após esta primeira intervenção cirúrgica Carl Johann Langenbuch, realizou em 1882, na cidade de Berlim, a primeira colecistectomia, tendo esta sido estabelecida desde então como procedimento de rotina para o tratamento da litíase biliar. Um século depois, Erich Mühe em 1985, Phillipe Mouret, em 1987, e Eddie Reddick e Douglas Olsen, no ano seguinte, realizaram os primeiros casos de colecistectomia através de acesso laparoscópico, na Alemanha, França e EUA, respectivamente (HERMANN, 1990; NASSIF, 1995; DE, 2003; ALEJANDRA et al., 2005; GEMBAL et al., 2007; TONETO et al., 2007).

Enquanto a flora bacteriana do trato biliar é considerada como inexistente em condições normais (EDLUND et al., 1959; SCOTT, 1971; RICO et al., 1989; WESTPHAL et al., 1999; SHEEN-CHEN et al., 2000), observa-se aumento percentual de culturas positivas na bile de pacientes portadores de colelitíase, principalmente na ocorrência de cálculos com pigmentos marrons e mistos (SCHWARTZ, 1969; WETTER e HAMADEH, 1994; COELHO, 1996; SILVA, 2003; PORTINCASA et al., 2006; STEWART et al., 2006).

Quadros inflamatórios agudos no trato biliar, processos obstrutivos congênitos ou adquiridos, realização de procedimentos endoscópicos, complicações cirúrgicas e a doença neoplásica da via biliar também elevam significativamente a incidência de bacteribilia (RAIA e OKUMURA, 1974; PITT et al., 1980; KADIR et al., 1982; MACHADO e GOFFI, 1983; WILLIS et al., 1984; LORENZ et al., 1998; NOMURA et al., 1999; LILLEMÖE, 2000). A presença de bactérias no trato biliar também é mais incidente em indivíduos com idade avançada, obesidade e a presença de doenças como diabetes mellitus, cirrose hepática ou outras condições que alterem a imunidade do paciente (RENKONEN, 1954; RAM e GHARAVI, 1970; ENGLAND e ROSENBLATT, 1977; NIELSEN et al., 1981; HAMBRAEUS et al., 1990; CSENDES et al., 1996; LINHARES et al., 2001; TRINDADE et al., 2004).

Com o intuito de identificar e prevenir o mais precocemente possível eventuais processos infecciosos de origem biliar, alguns autores estudaram a

presença de contaminação na bile mediante culturas simples, obtendo positividade variando entre 0 a 73% nos quadros não agudos (WILKIE, 1928; ELKELES e MIRIZZI, 1942; GOLDMAN et al., 1948; MASON, 1968; ANN LOU et al., 1977; SUZUKI et al., 1984; AL HARBI, 2001; LU et al., 2003) podendo chegar a 100% nas colecistites agudas complicadas com colangite, coledocolitíase e hepatolitíase (LEWIS et al., 1987; CSENDES et al., 1996; SHEEN-CHEN et al., 2000; FLORES et al., 2003). Esta grande variabilidade deve-se à associação de diversos fatores: processos infecciosos e obstrutivos da via biliar, co-morbididades dos pacientes e das diferentes técnicas de culturas utilizadas (NIELSEN e JUSTESEN, 1976).

Os avanços decorrentes dos estudos da biologia molecular realizados ao longo das últimas décadas permitiram a identificação de segmentos de DNA específicos a cada organismo vivo. O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR, através da qual pode-se amplificar segmentos pré-definidos de DNA, possibilitou que estes segmentos pudessem ser pesquisados em diversos tecidos, oferecendo, assim, forma alternativa à cultura para a identificação da presença de microrganismos, possivelmente com maior sensibilidade em relação à cultura convencional (EÇA, 2004; PINHO, 2005).

A pesquisa da sequência gênica 16S rRNA mediante a PCR tem sido largamente empregada em diversas linhas de pesquisa para identificação do DNA bacteriano, como a determinação de bactérias no humor aquoso em endofitalmite pós-operatórias (CHIQUEL et al., 2007), nas endocardites e osteomielites com hemocultura negativa (BOSSHARD et al., 2003 e LA SCOLA et al., 1997), na identificação de bactérias em meningites (TELÓ et al., 2007), no estudo de translocação bacteriana pré e pós colonoscopias (FERREIRA, 2007), na pesquisa do *Helicobacter pylori* na bile de pacientes com colecistite crônica calculosa (NERI et al., 2005), na identificação de DNA bacteriano em cálculos biliares pós colecistectomias videolaparoscópicas (SWIDSINSKI et al., 1998), na pesquisa de *Bacillus anthracis* em tecidos e sangue na luta contra o bioterrorismo (SACCHI et al., 2002), dentre outros.

Considerando-se a elevada variabilidade de incidências de bacteribilia relatadas na literatura mediante a utilização de culturas, a utilização da técnica de PCR para identificação de segmentos de DNA bacteriano oferece forma alternativa de análise desta questão. A experiência relatada com este procedimento demonstra maior sensibilidade quando comparada às técnicas convencionais de cultura devido

à possibilidade de detecção de quantidades bastante menores de bactérias, sendo estimadas até dez microrganismos como limiar de positividade (KANE et al., 1996).

Desta forma, embora a cultura e a técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR utilizem princípios distintos, quais sejam, respectivamente, o desenvolvimento de colônias ou a pesquisa de segmentos de DNA bacteriano, ambas informações são relevantes para o esclarecimento da real presença de bactérias na bile de pacientes portadores de colecistopatias. Assim sendo, a utilização de ambos os métodos pode se apresentar como procedimentos complementares para a elucidação da bacteribilia.

1.1 OBJETIVOS

- A) Determinar a incidência de bacteribilia mediante culturas automatizadas e detecção de DNA bacteriano de pacientes submetidos a colecistectomia videolaparoscópica para tratamento da colelitíase sintomática.
- B) Determinar se os resultados de positividade em culturas representam a real incidência de bacteribilia.
- C) Correlacionar os resultados obtidos no presente estudo, mediante os métodos de cultura automatizada e reação em cadeia da polimerase – PCR com a idade, estudo anatomo-patológico e tempo operatório.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COLECISTECTOMIAS (CONVENCIONAL E VIDEOLAPAROSCÓPICA)

A análise da história do tratamento da litíase biliar revela-nos que os procedimentos cirúrgicos usados sofreram modificações à medida que se foi esclarecendo a fisiopatologia do trato biliar.

A princípio deu-se mais importância ao cálculo, julgando-se ser ele o fator de maior relevância nas patologias biliares e pensava-se que bastava a sua retirada para curar a doença litiásica. Foi então a época em que o tratamento cirúrgico restringia-se à colecistotomia, isto é, a retirada dos cálculos e posterior sutura da incisão na vesícula biliar ou ainda a exteriorização da mesma na parede abdominal, procedimento este iniciado por Jean-Louis Petit em 1733 e aperfeiçoado nos anos seguintes por Carré (1833), Johann Ludwig Wilhelm Thudichum (1859), John Stough Bobbs (1867), J. Marion Simms (1878) e finalmente com Theodore Emil Kocher (1878) realizando a primeira colecistostomia com sucesso, seguido por Robert Lawson Tait (1879) e Willian S. Halsted em 1881, que operou sua própria mãe que estava ictérica e séptica.

Mais tarde, em vista dos fracassos observados com esse método de tratamento, os cirurgiões da época convenceram-se de que as alterações nas paredes da vesícula biliar também possuíam importante papel na manutenção da sintomatologia, inclinando-se para a remoção completa da vesícula biliar – a colecistectomia.

Com a teoria de que a vesícula biliar deveria ser removida não somente devido à presença de cálculos, mas sim por estar toda enferma, Carl August Langenbuch na cidade de Berlin em 1882, realizou a primeira colecistectomia, depois de vários anos de estudo e dissecação de cadáveres. Anos antes Zambecarri (1830) e Teckoff (1867), influenciaram de sobremaneira nos resultados da colecistectomia devido aos seus estudos experimentais em animais.

A cirurgia proposta por Langenbuch permaneceu como tratamento *gold standart* para pacientes com colelitíase sintomática por muitos anos. A idéia de melhorar a dor no pós-operatório e antecipar o retorno dos pacientes às suas

atividades o mais precocemente possível, se concretizou com as mini-laparotomias e foi definitivamente melhorado com o advento da cirurgia laparoscópica.

Em 12 de Setembro de 1985, Erich Mühe, na cidade de Böblingen, na Alemanha, realizou a primeira colecistectomia vídeo-laparoscópica. A operação durou cerca de duas horas e a paciente apresentou evolução excepcionalmente boa. Mühe ficou impressionado com a rápida recuperação da paciente, a ausência de dor no pós-operatório, a presença de movimentos intestinais imediatamente após a operação e o apetite da paciente na noite da cirurgia, descrito por ele, que o procedimento parecia “mágico”.

Em 1986, Aldo S. Kleiman de Rosário na Argentina descreveu um caso de colecistectomia laparoscópica em ovelhas.

Somente depois da nonagésima quarta colecistectomia laparoscópica realizada por Mühe na Alemanha, foi, que em Lyon, na França, Phillipe Mouret (1987) foi o segundo cirurgião a retirar a vesícula biliar por laparoscopia. (RAIA, 1974; NASSIF, 1995; HELMSTADTER, 1999; GARZA-VILLASENÖR, 2001; QUINTERO, 2004; CICERO et al., 2005; STORK et al., 2006; PORTINCASA et al., 2006; TONETO et al., 2007). Em 2005 estimou-se que foram realizadas mais de 500.000 colecistectomias por videolaparoscopia, apenas nos Estados Unidos (SCHIRMER et al., 2005) e em 2008, segundo o The Society for Surgery of Alimentary Tract, 750.000 cirurgias já foram realizadas neste ano (<http://www.ssat.com/cgi-bin/chole7.cgi>), consultado 06/10/2008.

2.2 BACTERIBILIA (ESTUDO POR CULTURA CONVENCIONAL E POR MÉTODOS AUTOMATIZADOS)

Com o intuito de aprimorar cada vez mais o diagnóstico de doenças infecciosas na via biliar e suas conseqüências locais e sistêmicas, iniciou-se nova fase no tratamento das patologias de causa biliar – o estudo da flora bacteriana na bile.

A cultura simples da bile, proveniente de punção direta da vesícula, da via biliar propriamente dita, durante a realização de procedimentos cirúrgicos ou ainda de punções externas (colangiografia percutânea transhepática), foram os métodos mais comumente utilizados para a coleta de amostras para a identificação de bactérias.

Dentre todos os métodos de cultivo bacteriano, os mais utilizados foram as culturas convencionais em placas sólidas e a cultura automatizada com frascos BacT/ALERT®, sendo estes últimos, os de maior sensibilidade e menor tempo para positividade, quando comparados aos métodos convencionais (BOURBEAU et al., 1998; SILVA, 2000; LAKSHMI, 2001). Devido ao grande número de estudos relacionados à prevalência de bactérias na bile, optou-se por apresentar os trabalhos mais relevantes, por décadas, permitindo ao leitor melhor entendimento da seqüência cronológica destes fatos. Os estudos descritos foram os de maiores citações na literatura e relevância para com o tema.

2.2.1 Início do século XX

ROSENOW, em 1916, nas cidades de Chicago e Rochester realizou um estudo misto, experimental e clínico, com o intuito de determinar o mecanismo de desenvolvimento da colecistite e relacioná-la com a bacteribilia. Realizou culturas de bile, fragmentos de vesícula biliar, cálculos e linfonodos de 47 pacientes operados por colecistite calculosa. Dezesseis culturas de bile das 29 realizadas apresentaram resultados positivos e estas foram inoculadas via endovenosa em animais de experimentação (cães, coelhos e porcos guinea), com o intuito de verificar o desenvolvimento da infecção vesicular.

Concluíram que a bile infectada de pacientes com colecistite aguda desenvolvia mais quadros de colecistite em animais do que as culturas provenientes de doenças crônicas. Afirmaram também a relação da presença de *Streptococcus* com a formação de cálculos e estes com o desenvolvimento de colecistite nos animais, por quadros obstrutivos.

2.2.2 Década de 20

Em 1928, WILKIE, em Montreal descreveu um estudo sobre a bacteriologia nas colecistites. O autor estudou 50 casos consecutivos de colecistectomias onde realizaram cultura de bile, cultura de fragmento de parede da vesícula biliar e cultura do gânglio cístico. Especificamente para a bile encontraram positividade de 12% com crescimento de *Streptococcus* em 2 casos, *Bacillus coli* em 3 casos e *Bacillus welchii*

em 1 casos. Quarenta e quatro culturas foram negativas, perfazendo 88% da amostra.

2.2.3 Década de 30

ANDREWS e HENRY, em 1935, na cidade de Chicago, descreveram a realização de cultura de bile e de fragmentos de parede de vesícula biliar em 91 pacientes subdivididos em 5 grupos específicos: grupo I (vesícula biliar normal – 8 casos), grupo II (colecistite calculosa assintomática – 12 casos), grupo III (colecistite com coledocolitíase – 4 casos), grupo IV (colecistite aguda calculosa – 31 casos) e grupo V (colecistite aguda em fase de quiescência – 36 casos). Com base nos seus resultados, realizaram estudo comparativo entre seus resultados e os demais trabalhos da época. Observaram cultura positiva para o grupo I em 12% dos casos, grupo II em 33%, grupo III: 100% dos casos estudados. Grupo IV: 42% e grupo V com positividade em 25% das culturas de bile. Observaram apenas 1 caso de crescimento de bactéria anaeróbia no grupo com colecistite aguda, dados estes semelhantes aos da literatura da época.

2.2.4 Década de 40

ELKELES e MIRIZZI, em 1942 na cidade de Córdoba, na Argentina, estudaram a presença de bactérias na bile do ducto hepático comum de 75 pacientes. Através de aspirado biliar pelo ducto cístico, compararam com dados obtidos da cultura de bile da vesícula biliar, secreção duodenal e fragmento de parede vesicular. Observaram cultura positiva em 45,29% dos casos, com predominância de *Bacillus coli*, seguidos de *Streptococcus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Staphylococcus*, dentre outras. Concluíram que a positividade estava diretamente relacionada à infecção de estruturas associadas, como por exemplo a hepatite, papilite de Oddi, colecistite, a discinesia coledociana, além da presença de cálculos na via biliar principal.

GOLDMAN, MORGAN e KAY, em 1948 na Universidade da Califórnia, desenvolveram estudo com 251 pacientes (160 com colecistite aguda calculosa – CAC e 91 com colecistite crônica calculosa – CCC), com o intuito de provar a relação entre a cultura de bile positiva e a taxa de mortalidade. Bile e um fragmento da

parede da vesícula biliar foram enviados para cultura. Os índices de positividade para a CAC foram de 36% (91 casos) e 21% (52 casos) para a CCC, do total de pacientes estudados. *Escherichia coli* foi a bactéria mais comumente encontrada e bactérias anaeróbias somente foram evidenciadas nos pacientes com CAC. A taxa de mortalidade foi significativamente mais alta nos pacientes com cultura positiva (79%), sendo a sepse a principal causa do óbito (53,3%).

2.2.5 Década de 50

ANDERSON e PRIESTLEY, em 1951, na Clínica Mayo em Rochester, estudaram 100 pacientes, sendo 54 com coledocolitíase residual e colecistectomia prévia (grupo I) e 46 pacientes portadores de colecistite sintomática com necessidade de exploração da via biliar (grupo II), com o objetivo de correlacionar a positividade da cultura da bile coledociana com a incidência de cálculos na via biliar. Nos pacientes do grupo I a cultura foi positiva em 81,5% dos casos e no grupo II em 52,1%. Dos 100 pacientes operados, 70 apresentaram cálculo na via biliar e 30 não. Dos setenta casos com coledocolitíase, 75% obtiveram cultura positiva (53 casos) com *Escherichia coli* em 69,8% das culturas e sem crescimento bacteriano anaeróbico. Nos pacientes sem coledocolitíase (30 casos) a cultura foi positiva em 50%. A presença de bactérias também foi mais evidente nos pacientes com cirurgia prévia (64,7%). Desta feita concluíram que existe grande relação da cultura positiva nos casos de coledocolitíase em comparação com aqueles em que a via biliar estava livre de cálculos, principalmente nos casos de cirurgia biliar prévia.

EDLUND, MOLLSTEDT e OUCHTERLONY, na Universidade de Gotemburgo, em 1959, analisaram a incidência de bactérias no trato biliar e no fígado de pacientes com colecistite aguda e crônica (com ou sem cálculos). Foram realizadas biópsias e culturas para bactérias aeróbias e anaeróbias de fígado, bile vesicular, bile do ducto hepático comum, fragmento de parede da vesícula e de sangue de 305 pacientes. As culturas foram realizadas por dois métodos similares, com períodos diferentes de incubação e meios de cultura semelhantes. O primeiro método (154 pacientes) mostrou positividade de 14% em culturas de bile. No segundo método (151 pacientes) observaram 37% de culturas de bile positivas, principalmente nos quadros de colecistite crônica calculosa com coledocolitíase e colecistites agudas. A principal

bactéria encontrada foi a *Escherichia coli*. *Clostridium welchii* foi observado somente em casos de colecistite aguda.

2.2.6 Década de 60

FLEMMMA, FLINT, OSTERHOUT e SHINGLETON, em 1967, em Durham – EUA, estudaram a flora bacteriana intra e extra-hepática através de aspiração e cultura de bile durante colangiografia percutânea transhepática e colecistectomias, em pacientes portadores de obstrução da via biliar (grupo I) e colecistite crônica calculosa (grupo II), respectivamente. No grupo II a positividade na bile aspirada da vesícula biliar foi de 47,61% em comparação com as culturas positivas do grupo I (42,6%). Observaram crescimento bacteriano de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Aerobacters* e *Proteus* e nenhuma bactéria anaeróbia foi identificada nos meios de cultura.

SCOTT e KHAN (1967), em Londres, também estudaram os resultados de culturas de bile pós aspiração em colangiografias e por punção do ducto hepático comum durante laparotomias. Os pacientes foram divididos em 4 grupos distintos: colecistite crônica calculosa com coledocolitíase e icterícia (A), estenose biliar pós colecistectomia associada a icterícia (B), icterícia por tumor de colédoco distal (C) e icterícia por tumor de ducto hepático comum (D), ambos os grupos C e D sem doença prévia da via biliar. A cultura de bile foi positiva em 83% no grupo A, 100% no grupo B e inexistentes nos grupos C e D. A *Escherichia coli* foi a bactéria mais comumente encontrada e não houve crescimento de bactérias anaeróbias. Os autores concluíram que a colangite que complica a obstrução da via biliar está relacionada à doença biliar pré-existente.

2.2.7 Década de 70

CHETLIN e ELLIOTT, em 1971, na cidade de Pittsburgh, estudaram 1421 pacientes operados por doenças da via biliar, sendo destes 1194 colecistectomias e 227 cirurgias no colédoco. Duzentas e quarenta culturas de bile foram realizadas, com um índice de positividade de 33%, com *E. coli* em 27 casos, *Klebsiella* em 13, *Clostridium* em 1 caso, dentre outros. Observaram que pacientes idosos tiveram maior incidência de culturas positivas que os mais jovens. De todas as complicações

existentes, 62% tiveram cultura biliar positiva e apenas 4% negativa. Complicações sépticas foram 40 vezes mais freqüentes nos casos de cultura positiva. Ocorreram 22 óbitos, destes 41% devido a sepse.

CHETLIN e ELLIOTT (1973), em Pittsburgh, realizaram estudo com 245 pacientes submetidos a cirurgias biliares. Foram divididos em 2 grupos de acordo com o risco de complicações sépticas. O primeiro foi composto por 127 pacientes com diagnóstico de colecistite crônica calculosa e abaixo de 70 anos e o segundo grupo foi formado por pacientes considerados de alto risco (34 pacientes com mais de 70 anos, 24 casos de colecistite aguda calculosa, 19 com icterícia obstrutiva e 7 com coledocolitíase sem icterícia). A cultura de bile foi positiva em 17% dos pacientes considerados de baixo risco com índice de complicações infecciosas de 1,2%. No grupo de alto risco, a cultura biliar obteve índice de positividade de 52% e complicações infecciosas ocorreram em 46% dos casos. Concluíram ser importante a realização da cultura de bile, principalmente nos pacientes de alto risco para sepse, além do uso sistemático de antibioticoterapia.

CSENDES, FERNANDEZ e URIBE, na cidade de Santiago, no Chile, em 1975, desenvolveram estudo comparativo entre cultura de bile de pacientes com vesículas biliares consideradas normais (20 casos), isto é, sem aparência externa de doença ou cálculos, sem sinais clínicos de doença biliar (cólica biliar ou icterícia) e colecistograma oral normal, com pacientes portadores de colecistopatia calculosa crônica (30 casos) e aguda (30 casos). Em 100% das culturas nas vesículas normais o resultado foi negativo para crescimento bacteriano, nos pacientes com colecistite crônica calculosa a positividade foi de 70% (21 pacientes) e nos casos agudos 57% (17 pacientes). Em nenhum grupo houve crescimento de bactérias anaeróbicas na bile.

DELIKARIS, MICHAIL, KLONIS, HARITOPOULOS e GOLEMATIS, em 1977 na cidade de Atenas, na Grécia, estudaram 174 culturas de bile de pacientes provindos de 3 grupos distintos: grupo I (colecistite aguda – 9 pacientes), grupo II (colecistite crônica calculosa – 119) e grupo III (icterícia obstrutiva – 46). Observaram 45 casos positivos das 174 culturas realizadas, uma positividade de (25,86%) e infecção de ferida operatória em 7,47% dos casos. Concluíram que a incidência de

cultura foi maior no grupo I com 100% de casos positivos, tendo influência direta nas contaminações de ferida operatória e complicações sépticas, fatos estes agravados pela idade avançada.

2.2.8 Década de 80

TABATA e NAKAYAMA, em Fukuoka, no Japão, em 1981, realizaram estudo comparando a relação do resultado da cultura de bile em pacientes com cálculos na via biliar (vesícula e ducto hepático comum) *versus* o tipo de cálculo encontrado após análise química de sua composição. Os cálculos em estudo foram os de colesterol puros, de cálcio com pigmentos biliares (cálculos marrons), pigmentos biliares puros (cálculos negros) e os mistos. A maior positividade na cultura de bile foi vista em presença de cálculos marrons (91,4%), seguidos dos mistos (53,3%). As bactérias mais comumente encontradas foram as aeróbias gram positivas e negativas e as anaeróbias somente nos cálculos marrons. Em 100% dos casos de cálculos marrons no ducto hepático comum as culturas foram positivas, com maior incidência de anaeróbios em comparação com os demais cálculos. As infecções de ferida operatória também foram mais prevalentes nos pacientes portadores de cálculos de cálcio com pigmentos biliares e com cultura positiva para anaeróbios. Concluíram que tanto bactérias aeróbias quanto anaeróbias contribuem na formação de cálculos de cálcio com pigmentos biliares, pela produção de beta-glucoronidase desconjugando a bilirrubina glucoronide em bilirrubina livre que associada ao cálcio irá formar o cálculo.

PITT, POSTIER e CAMERON, em 1982, em Baltimore, estudaram 134 pacientes com doença biliar diversas e coletaram amostras de bile para cultura durante coledocotomias, analisando os pacientes de maior risco para complicações e sua relação com o resultados das culturas.

A bacteribilia foi de 66% (88 amostras) do total estudado, sendo destes 82% em coledocolitíase, 86% em estenoses benignas da via biliar e 80% em pacientes com história de colangite. Estes dados quando analisados com a positividade em pacientes idosos (acima de 60 anos) (77%), produziu um resultado estatisticamente significativo ($p < 0.01$). As complicações pós-operatórias foram mais presentes quando a cultura de bile foi positiva. A infecção da ferida operatória foi identificada em 16 casos, sendo 14 (88%) com cultura positiva ($p < 0,05$). As bactérias mais comumente

encontradas foram as aeróbias gram positivas e negativas. O crescimento de bactérias anaeróbias esteve relacionado ao pacientes mais idosos e com doenças biliares mais complexas (obstrutivas).

PITT, POSTIER e CAMERON, em 1983, no Johns Hopkins Medical Intitution, em Baltimore – EUA, realizaram estudo comparando a bacteribilia de 73 pacientes com colangite pré-operatória ou sem ela, correlacionando-os com o resultado da cultura biliar, a presença de infecção de ferida operatória, relação com idade, cálculos de via biliar e icterícia. Dos 73 pacientes estudados, 53 eram portadores de colecistite crônica calculosa com coledocolitíase e 20 com cálculos residuais de colédoco (primários ou não). A cultura da bile foi positiva em 75% dos casos, sendo destes 88% com colangite pré-operatória e 65% sem colangite ($p<0,025$), a infecção da ferida operatória foi mais evidenciada em pacientes com colangite (12%). A presença de pacientes mais idosos (acima de 60 anos) foi estatisticamente significativa nos pacientes com colangite em comparação com os sem colangite ($p<0,001$). Os cálculos residuais ou primários de colédoco foram mais prevalentes nos pacientes com colangite ($p<0,01$) o mesmo acontecendo nos casos de icterícia ($p<0,01$).

TRUEDSON, ELMROS e HOLM, na Suécia, no ano de 1983 investigaram a presença de bactéria patogênicas e oportunistas na bile de 211 pacientes submetidos a cirurgias eletivas – grupo I (177) e a colecistectomias por colecistites aguda – grupo II (34), comparando seus resultados com a morbidade pós-operatória. As bactéria patogênicas foram classificadas como aquelas pertencentes principalmente à flora intestinal e associadas a complicações pós-operatórias (*E. coli*, *Enterococci*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*) e as oportunista como aquela consideradas mais raras, causadoras de complicações em cirurgias abdominais (*S. epidermidis*, *H. parainfluenza*, *C. albicans*, *Diphtheroid*, dentre outras). As culturas foram positivas para as cirurgias eletivas em 16,4% (29 pacientes) e 58,8% (20 pacientes) nas colecistites agudas sendo o resultado estatisticamente significativo ($p<0,001$). A maior incidência de bactéria patogênicas também foi no grupo II (35%) em comparação com o grupo I (7%) ($p<0,001$). A morbidade pós-operatória que incluía, dentre outros fatores, a infecção da ferida operatória e o abscesso intra-abdominal, foram estatisticamente mais significativos ($p<0,01$) no grupo de colecistites agudas (35%)

em comparação com o grupo I (13%). Esses resultados demonstraram claramente a relação da bacteribilia com a evolução pós-operatória do doente.

MACHADO e GOFFI, em São Paulo (1983), realizaram estudos bacteriológicos de amostras biliares de 55 pacientes submetidos à cirurgia das vias biliares extra-hepáticas devido a colecistopatias litíasicas crônicas e agudas. Obtiveram taxas de positividade de 34,5% para bactérias anaeróbias com principal predomínio para a quinta e sexta décadas. A análise estatística dos resultados apresentou significância com relação ao diagnóstico de patologia aguda e a existência de coledocolitíase. No ano seguinte utilizando a mesma amostragem, os mesmos autores (MACHADO e GOFFI, 1984) analisaram a relação dos dados clínicos e radiológicos pré e intra-operatórios com a presença de bacteribilia. Observaram significância estatística com relação à presença de icterícia, febre, diagnóstico de patologia aguda e colangiografia operatória anormal. Não houve associação com o tempo de história clínica ou com o achado radiológico pré-operatório.

BRENNER, MARCHESINI, MALAFAIA, COELHO, SOUZA, SOUZA e WIEDERKEHR, no Hospital de Clínicas de Curitiba no ano de 1987, realizaram estudo bacteriológico na bile através da cultura simples e bacterioscopia pelo Gram de 79 pacientes operados de patologias das vias biliares. Os pacientes foram divididos em dois grupos distintos. No primeiro (42 pacientes) foi realizado colecistectomia simples e a antibióticoterapia foi instituída apenas se culturas positivas (8 casos, 19%). No segundo grupo (37 pacientes), todos foram submetidos a colecistectomias complicadas devido a processos infecciosos agudos e associação com fatores de risco. A cultura foi positiva em 28 casos (75,6%) e bacterioscopia em 25 casos (67,5%). Concluíram que a bacterioscopia é um método confiável para a detecção de germes na bile de pacientes submetidos à cirurgia do trato biliar, com índice de acerto de 85%.

2.2.9 Década de 90

HOROWITZ e TIMM, em 1991, em Porto Alegre, procuram caracterizar dados clinicolaboratoriais em pacientes submetidos à cirurgia da árvore biliar e estimar sua relação com a infecção biliar. Foram analisados 117 culturas de bile, onde a positividade foi de 44% (51 casos). *E. coli* e *Klebsiella* foram os germes mais prevalentes. A sensibilidade e especificidade foram elevadas apenas para a fosfatase alcalina, concluindo, assim, que a sua elevação pareceu ser o dado mais sugestivo de infecção biliar.

OHDAN, OSHIRO, YAMAMOTO, TANAKA, INAGAKI, SUMIMOTO e HINOI, na cidade de Hiroshima, em 1993, estudaram a microflora na bile de 303 pacientes submetidos a cirurgia para a colelitíase, com o propósito de quantificar e identificar a bacteribilia e correlacioná-la com a cultura de cálculos biliares. A cultura biliar foi positiva em 38% dos casos com maior incidência em pacientes acima de 70 anos. O estudo comparativo entre as culturas positivas de cálculos de colesterol (165) – 22,4% e de pigmentos biliares – marrons (91) – 64,8%, foram estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Tanto nas culturas de bile como de cálculos pigmentados, as bactérias predominantes foram a *E. coli* e a *Klebsiella*. Anaeróbios foram somente identificados nos cálculos marrons. Infecção de ferida operatória ocorreram em apenas dois casos (1,3%), com crescimento de somente germes aeróbios.

HOED, BOELHOUWER, VEEN, HOP e BRUINING, em 1998, na Universidade de Rotterdam, estudaram 637 pacientes com colecistopatias com a finalidade de determinar a incidência de infecção pós-operatória (ferida cirúrgica) após a realização de colecistectomias convencionais (aberta) *versus* laparoscópica, além de determinar a bacteribilia provinda de cada acesso cirúrgico. A incidência geral de infecção de ferida operatória foi de 14% (89 casos), fato este agravado pela alta incidência de pacientes de alto risco (presença de diabetes, hipertensão, obesidade, idosos, imunodeprimidos e cirurgias de emergência). Foi significativamente maior a incidência de infecção de ferida operatória no grupo de cirurgia convencional quando comparada ao grupo de laparoscopia, onde somente 5,3% (10 dos 189 que realizaram a laparoscopia) apresentaram infecção.

A cultura de bile foi positiva em 22% de todos os casos, sendo destes 2,8% nas laparoscópicas e 13% nas abertas. Os microorganismos mais comumente encontrados foram a *E. coli* (56 casos), *Klebsiella spp.* (20) e *Streptococcus spp.* (16) em ambos os grupos.

Após a análise das feridas infectadas, os autores concluíram que não havia relação entre a cultura biliar positiva e os resultados das culturas de secreção das feridas infectadas, mas que havia diferença estatisticamente significativa na bacteribilia entre os grupos estudados.

2.2.10 Século XXI

AL HARBI, OSOBA, MOWALLAD e AL-AHMADI, no ano de 2001, em Jeddah na Arábia Saudita, estudaram 112 pacientes submetidos a colecistectomia videolaparoscópica com o objetivo de identificar a microflora na bile, através da cultura em frascos BacT/ALERT®, além de correlacioná-la com índices de infecção em feridas operatórias. Das 112 amostras estudadas, 28 (25%) foram positivas, sendo as bactérias mais comumente encontradas a *E. coli* (28,1%), *Enterococcus faecalis* (15,6%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9,4%). Em somente uma cultura foi observado crescimento de *Aeromonas hydrophilia* e *Enterobacter cloacae*. Nenhum caso de bactéria anaeróbia foi observado. A infecção da ferida operatória teve positividade em 1,8% (2 pacientes) dos casos e a cultura de bile foi significativamente maior em pacientes com idade acima de 50 anos ($p < 0,005$).

LINHARES, PAIVA, CASTELO FILHO, GRANERO, PEREIRA, MACHADO, GOLDENBERG e MATOS, em 2001, na cidade de São Paulo, estudaram a associação entre o quadro clínico pré-operatório e os resultados das culturas de bile e da parede da vesícula biliar. Foram avaliados 38 pacientes portadores de colecistite aguda calculosa, submetidos à cirurgia de urgência, levando em conta a história clínica, exame físico, investigação laboratorial e resultado da cultura. A cultura foi positiva em 68,2% dos casos e foram identificados cinco variáveis pré-operatórias como preditivas de bacteribilia: idade acima de 55 anos, temperatura diferencial axilo-retal maior que $0,4^{\circ}\text{C}$, leucocitose acima de 12000 cels/mm^3 , neutrofilia acima de 75% e bastonetes acima de 4%. Concluíram que a bacteribilia pode ser previsível no pré-operatório.

RERKNIMITR, FOGEL, KALAYCI, ESBER, LEHMAN e SHERMAN, no ano de 2002, em Indianápolis, estudaram os resultados de culturas de bile em frasco BacT/ALERT® em 180 amostras coletadas pós colangiopancreatografia endoscópica retrógrada em pacientes com doença biliar, sendo destes 111 com *stent* biliar e 69 sem. A cultura geral demonstrou positividade de 82% (147 amostras), onde 55% (38) não eram portadores de prótese biliar e 98% (109) tinham *stents* biliares ($p<0,05$). O *Enterococcus* foi a bactéria mais comumente encontrada nos pacientes com *stent* (30,5%) e a *E. coli* nos sem prótese. Pacientes com *stent* apresentaram maior incidência de bacteribilia polimicrobiana em comparação com o outro grupo em estudo ($p<0,001$) e a análise de infecção anaeróbia foi extremamente baixa, com apenas 4% de positividade.

LU, XIANG, SHI e ZHANG, na China em 2003 realizaram culturas de bile em 59 pacientes submetidos a colecistectomia eletiva por colecistite crônica calculosa sintomática. As culturas automatizadas foram realizadas em frascos BacT/ALERT®. A taxa total de crescimento bacteriano foi de 72,9% (43 casos), sendo destes 6,8% exclusivamente anaeróbios (4 casos), 20,3% de aeróbios (12 casos) e 45,8% de culturas mistas. *Bacteróides fragilis* foram encontrados em 38% dos casos com cultura positiva para anaeróbios e *E. coli* 37% para os aeróbios, dados estes condizentes com os descritos na literatura.

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR

A evolução da biotecnologia, da descoberta da estrutura do DNA e até a terapia gênica experimental tem sido marcadas por descobertas revolucionárias e por avanços técnicos fascinantes. A biologia molecular é uma ciência que estuda as biomoléculas e suas funções específicas nas células e nos organismos como um todo. Seu elemento central é o ácido desoxirribonucléico, o DNA, responsável pela codificação da síntese de proteínas, as quais irão determinar e coordenar as funções celulares (SILVA, 2004; OLIVEIRA, 2004; PINHO, 2005).

Sua história teve início em 1866 quando o monge agostiniano, botânico e metereologista austríaco Gregor Johann Mendel publicou seus primeiros experimentos relacionados a existência de características individuais, neste caso de

flores e ervilhas, devido a existência de um par de unidades elementares de hereditariedade (Lei de Mendel), agora conhecidas como genes (COX, 1999; EÇA, 2004; RAMDE, 2005).

Em 1869, o bioquímico alemão Johann Frederick Miescher descobriu no núcleo das células de experimentos de pús humano e espermatozoides de salmão, uma substância de característica ácida com alto teor de fósforo e nitrogênio, desprovidos de enxofre e resistentes à pepsina (enzima proteolítica), a qual chamou de nucleína, sendo posteriormente chamada de ácido desoxirribonucleico (DNA). Em 1888, outro pesquisador alemão, Albrecht Kossel, demonstrou que a nucleína continha bases nitrogenadas em sua estrutura, explicando o fato da nucleína ser rica em nitrogênio. Nove anos depois Richard Altmann, que foi aluno de Miescher, obteve a nucleína com alto grau de pureza, comprovando sua natureza ácida e dando-lhe o nome de ácido nucleico. Anos antes, em 1882, Walter Flemming descobriu corpos com formato em bastão dentro no núcleo das células, que denomina de cromossomo (EÇA, 2004; LUPPINO e SANT'ANNA, 2005; RAMDE, 2005).

O dinamarquês Wilhelm Johannsen, no ano de 1909, introduziu o termo gene para descrever a unidade mendeliana da hereditariedade. Thomas Hunt Morgan, em 1912, publicou um livro relatando experimentos demonstrando que os genes estão dispostos linearmente nos cromossomos, no mesmo ano em que Phoebus Levine e Walter Jacobs concluíram que o componente básico dos ácidos nucleicos era estrutura composta por uma unidade que se constituía numa base nitrogenada ligada a uma pentose e esta, por sua vez, ligada a um fosfato. Esta unidade foi denominada de nucleotídeo (EÇA, 2004).

Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod e Maclyn McCarty, em 1944, comprovaram que o DNA é o portador da informação genética. No ano de 1953, Francis Harry Crompton Crick e James Dewey Watson apresentaram o modelo estrutural do DNA como duplas hélices complementares, semelhantes à estrutura de um caracol, sendo este o verdadeiro início da Biologia Molecular (EÇA, 2004; OLIVEIRA, 2004; LUPPINO e SANT'ANNA, 2005; RAMDE, 2005).

Entre todas as propriedades dos organismos vivos, a capacidade de auto-replicação é fundamental. Conter a informação genética significa não somente armazenar e transmitir ao longo das gerações, mas expressar, ou seja, servir de molde para a síntese de RNAs e alguns desses serem traduzidos nas proteínas correspondentes (ANTONINI, 2004).

2.4 DNA

Uma molécula de DNA consiste em duas longas cadeias polinucleotídeas compostas de quatro tipos de subunidades de nucleotídeos. Cada uma dessas cadeias é conhecida como uma cadeia de DNA ou uma fita de DNA (FIGURA 1).



FIGURA 1 - ESTRUTURA DO DNA

FONTE: PINHO, M. (2005)

NOTA: A: Primeiro esboço esquemático do DNA desenhado por Harry e Crick (1953); B e C: Modelo atual da molécula de DNA

As duas cadeias, embora paralelas, apresentam-se ao longo de toda a molécula de DNA enroladas em um aspecto helicoidal e são mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos. Esses são açúcares de cinco carbonos ao qual estão ligados um ou mais grupos fosfatos e uma base contendo nitrogênio. No caso específico do DNA, este açúcar é a desoxirribose, por esse motivo chamado de ácido desoxirribonucléico.

As bases se ligam aos açúcares e estão voltadas para dentro da dupla fita, conforme determinado pela Regra de Chargaff: adenina (A) ligada a timina (T) através de duas pontes de hidrogênio e a guanina (G) com a citosina (C) através de três pontes de hidrogênio. (ALBERTS et al., 1999; SILVA, 2004; OLIVEIRA, 2004; PINHO, 2005)

2.5 GENE 16S rRNA

Genes são segmentos de seqüências de nucleotídeos contendo o código de uma ou mais proteínas o qual, através de um processo denominado como transcrição dará origem a molécula de RNA mensageiro (RNAm), cuja função é promover a síntese proteica no ribossomo através de uma reação com outra molécula de RNA, esta denominada como transportadora (RNAt). Como estas apresentam em sua estrutura um aminoácido, esta reação progressiva dará origem a um polipeptídeo proteico. O gene utilizado neste estudo para a detecção de bactérias é o gene 16S rRNA, o qual tem sido de grande importância no desenvolvimento da biologia molecular e microbiologia, por tratar-se de um segmento de DNA comum a todas as bactérias. Sua aplicação foi primeiramente proposta por Carl Woese na Universidade de Illinois, no início da década de 1970. Sua função é codificar uma molécula de RNA ribossomal, a qual irá atuar nos ribossomos auxiliando na síntese protéica. Corresponde a seqüência específica curta de nucleotídeos que aparecem em todos os membros de determinado grupo filogenético. O gene 16S rRNA é a macromolécula mais amplamente utilizada em estudos de filogenia e taxonomia bacteriana (BROSIUS et al., 1978; WOESE, 1987; OLSEN e WOESE, 1993; CORLESS et al., 2000; HIRAMATSU et al., 2000; SCHÖNHUBER et al., 2001; LEONG e SUNG, 2002; RODICIO e MENDOZA, 2004; PETTI, 2007).

2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi primeiramente descrita por Kjell Kleppe em 1971 no *Journal of Molecular Biology*, porém sem muito crédito. Foi concebida e consagrada por Saiki em 1985 e Kary B. Mullis em 1987, na cidade de Emeryville, Califórnia. Desde a sua concepção, causou verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramentos genéticos (KLEPPE et al, 1971; SAIKI et al., 1985; MULLIS e FALOONA, 1987; FRANÇA 1998; MESQUITA et al., 2001; ANTONINI, 2004; PINHO, 2005; CARRAPA et al., 2005).

PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase em um curto espaço de tempo. Esta técnica permite obter-se cópias de parte do material genético em quantidades suficientes que permitam detectar e analisar a seqüência que é o alvo do estudo. A reação explora a função natural da enzima chamada de taq-polimerase, extraída da bactéria *Thermus Aquaticus*, que é uma enzima termoestável (MULLIS e FALOONA, 1987; LIN et al., 1995; FOX et al., 1995; ALBERTS et al., 1999; HO et al., 2000; YAMADA et al., 2003; BAREA et al., 2004; PINHO, 2005; CARRAPA, 2005; METZKER e CASKEY, 2006).

O fato central que faz a PCR ser útil é que todo organismo vivo possui seqüências de nucleotídeos no DNA que são únicos e específicos para cada espécie. Esta reação permite a amplificação de qualquer seqüência de DNA coletada de amostras de materiais biológicos (sangue, bile, suco gástrico, saliva, placa dentária, fezes, biópsias de órgãos, etc) humanos ou não (animais e vegetais), mesmo não conhecendo a seqüência total de gene a ser analisado (FOX et al, 1995; RILEY et al., 1996; MONTEIRO et al., 1997; MANSFIELD et al., 1998; RUDI et al., 1999; BRAVOS et al., 2000; SILVA, 2003; YAMADA et al., 2003).

Para a execução da técnica da PCR é preciso que se tenha conhecimento prévio da seqüência do ácido nucléico que se deseja amplificar, chamada de seqüência alvo. A partir disto, desenham-se dois iniciadores, para dar partida ao processo de síntese em um local específico. Estes iniciadores ou *primers* são uma pequena seqüência de nucleotídeos (20 a 30 pares de bases – bp), em número de dois, que são sintetizados artificialmente de maneira que sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo, isto é, que hibridizem/pareiem no início da seqüência alvo que se quer amplificar e da qual ele é complementar. Um iniciador serve para sintetizar a seqüência alvo no sentido 3' - 5' e outro para o sentido inverso, isto é, 5' - 3' em suas extremidades (MULLIS e FALOONA, 1987; FRANKLIN et al., 1996; FOX et al., 1998; ALBERTS, 1999; HO et al., 2000; SILVA, 2003; EÇA et al., 2004, ANTONINI, 2004).

Ao reconhecer o iniciador, a polimerase sintetiza uma cópia complementar, obedecendo à informação contida na seqüência de DNA que será replicada.

A reação em cadeia da polimerase é feita no termociclador, onde a molécula de DNA é inicialmente desnaturada pelo aumento da temperatura (92 a 95°C), isto é, ocorrendo a separação das fitas de DNA. A temperatura é então rapidamente

reduzida (45 a 65°C), permitido que cada iniciador pareie ou hibridize, com sua seqüência complementar, presentes nas extremidades do segmento que vai ser copiado. Mediante um novo aumento da temperatura (70 a 75°C) a enzima DNA polimerase realiza a extensão da nova fileira de nucleotídeos. O ciclo de desnaturação, hibridização e extensão se repete muitas vezes, resutando em milhares de cópias do segmento desejado, seguindo progressão geométrica, de maneira que depois de apenas 30 ciclos, são produzidos mais de 1,4 bilhões de vezes a quantidade inicial da seqüência alvo (MULLIS e FALOONA, 1987; LIN et al., 1995; FOX et al., 1998; ALBERTS et al., 1999; NILSSON et al., 2000; HIRAMATSU et al., 2000; SILVA, 2003; ANTONINI, 2004).

2.7 ESTUDO DO DNA BACTERIANO NA BILE POR PCR

O histórico da pesquisa de bactérias na via biliar, com suas conseqüências e malefícios, estimularam vários autores a aprimorarem este estudo mediante uso da PCR, não somente identificando a presença de DNA bacteriano, mas dando nome e características da bactéria achada.

MYUNG, MYUNG-HWAN, SHIM, KIM, KIM, PARK, YOO, LIM, SEO, LEE, MIN e KIM no ano de 2000, em Seoul, na Coréia, pesquisaram a presença de DNA de *Helicobacter pylori* na bile, cálculos, fragmentos de vesícula biliar e fragmentos de ducto hepático comum pós colangiopancreatografia retrograde endoscópica e colecistectomias em 74 pacientes. Todos os pacientes realizaram previamente o teste de ELISA para detecção do *H. pylori*, estudo anatomopatológico das amostras e estudo laboratorial da bile. A extração do DNA foi pelo método de fenol-clorofórmio e a PCR utilizou os *primers urease A* e 26 kDA. O teste sorológico foi positivo em 63 pacientes (85%) e a PCR em apenas 16,3% (7 casos). A análise laboratorial evidenciou a presença do *H. pylori* na bile com níveis de pH mais baixos devido à precipitação de ácidos biliares com glicina conjugada. Não foi observada nenhuma relação estatisticamente significativa entre os elementos constituidores da bile (colesterol, ácidos biliares ou fosfolipídeos) e a positividade no método de PCR.

BULAJIC, STIMEC, MILICEVIC, LOEHR, BORICIC, LOVACEVIC e BULAJIC, em Belgrado (2001) estudaram e avaliaram a especificidade e confiança do método de PCR para detecção do *Helicobacter pylori* em algumas doenças do trato biliar. Foram analisadas bile de 87 pacientes pós colecistectomia (4) e colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE) (83). A PCR com *primers* específicos para o *H. pylori* (gene urease A) foi realizada e o seu resultado foi determinado após eletroforese com gel de agarose a 1%. A positividade para o método proposto foi de 55,2% (48 casos). Como dados complementares observaram PCR positiva em 35 casos de doenças benignas e 13 em malignas. Concluindo que a PCR é um método de alta especificidade e sensibilidade para detecção da sequência genética do *H. pylori* na bile, onde este material genético existe em muito baixa concentração.

HAYAKAWA, EDAMOTO, XIN, TRAN, IWAKI, SATO, SARA e ABE, em Tóquio no ano de 2001 pesquisaram a presença de DNA vírus, chamado de TTV na bile de 16 pacientes pós colecistectomia laparoscópica. A técnica de amplificação por PCR foi utilizada após extração do DNA viral. Foram utilizados *primers* específicos (T801 e T935) e o resultado da PCR foi detectado pela eletroforese em gel de agarose a 2%. Oito casos (50%) foram positivos para a presença de DNA de TTV, se igualando aos casos descritos na literatura e quando comparados com a pesquisa no sangue. Confirmando a transmissibilidade deste vírus não somente via parenteral, mas como não parenteral (fecal-oral).

MATSUKURA, YOKOMURO, YAMADA, TAJIRI, SUNDU, HADAMA, KAMIYA, NAITO e FOX, no ano de 2002, em estudo multicêntrico no Japão e na Tailândia, estudaram a presença do *Helicobacter bilis* na bile de pacientes com doença biliar calculosa e em pacientes com neoplasia de via biliar (câncer de vesícula, via biliar principal e peri-ampular). Ao total foram estudados 85 pacientes através de culturas e PCR. A extração do DNA foi pelo método do fenol-clorofórmio, seguido pela PCR com o gene ribossomal 16s e com *primers* específicos para o *H. bilis* (HEBI – F1, HEBI – R1, HEBI – F2 e HEBI – R2). A eletroforese foi em gel de agarose. O objetivo do estudo, além da identificação da bactéria foi correlacioná-la com a doença neoplásica. Os resultados indicaram 38 a 50% de positividade para a presença do *H.*

bilis, pelo método de PCR na bile de pacientes com doença benigna e 79 a 87% nos pacientes com doença maligna, demonstrando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Concluindo sobre a eficiência do método e da forte relação desta bactéria com os riscos de câncer da via biliar.

BULAJIC, STIMEC, MILICEVIC, LOEHR, MUELLER, BORICIC, KOVACEVIC e BULAJIC em Belgrado (2002), pesquisaram a presença de *H. pylori* mediante o seu gene urease A (*primer*) em 72 pacientes, sendo destes 48 com colecistite crônica calculosa, 17 com colangite e 7 sem doença biliar. Todos os pacientes realizaram o teste rápido da urease para indentificação da bactéria durante a endoscopia digestiva. A positividade deste teste ocorreu em 57 pacientes (79%). O DNA da bile foi extraído segundo a técnica de fenol-clorofórmio e a técnica de PCR com o gene urease As A PCR foi positiva em 35 pacientes com doença biliar, sendo destes 26 (54,2%) sem colangite e 9 casos com colangite. Com base nestes resultados concluíram que não existe diferença estatisticamente significativa quando comparados os achados da PCR e do teste da urease.

FARSHAD, ALBORZI, MALEKHOSSEINI, GRAMIZADEH, OBOODI, RASOULI, JAPONI, KALANI e POURABBAS, no Irã (2006), coletaram 38 fragmentos de vesícula biliar e 36 amostras de bile de 38 pacientes com doenças da via biliar. Realizaram cultura das amostras, teste rápido da urease e PCR com os genes 16S rRNA e desidrogenase de isocitrato para pesquisa da bactéria gram negativa *Helicobacter pylori*, e seu DNA. Como grupo controle analisaram 40 vesículas normais provenientes de autópsias. Todas as culturas foram negativas para *H. pylori*, porém 11% dos casos (4 amostras de bile de colecistite crônica calculosa) estudados pelo método da PCR foram positivos. Concluíram então que o *H. pylori* não faz parte da flora normal da vesícula, porém pode ter relação com os quadros crônicos da vesícula biliar.

JANG, KIM, YU e LEE em 2007, na República da Coréia estudaram a presença de parasitas (*Ascaris lumbricoides* e *Clonorchis sinensis*) em cálculos biliares de 20 pacientes. Todos os cálculos foram coletados através de colangiopancreatografiografia retrógrada endoscópica e durante cirurgias da via biliar. Quinze cálculos eram provenientes do ducto hepático comum de pacientes com

colangite e apenas cinco da vesícula biliar em pacientes com colecistite aguda. A identificação do DNA do parasita nos cálculos foi realizada através da técnica de PCR e sequenciamento de DNA com os genes 28S e 18S rDNA. Este estudo demonstrou PCR positiva em 3 casos para *C. sinensis* e 1 para *As lumbricoides* nos cálculos do ducto hepático comum. Os cálculos da vesícula biliar apresentaram resultados negativos. Quando os resultados da pesquisa de DNA pelo método de PCR foram comparados com exames parasitológicos de fezes, testes intradérmicos, pesquisa de eosinofilia no hemograma ou ainda história clínica, todos esses revelaram dados negativos para a presença de *Ascaris lumbricoides* e *Clonorchis sinensis*, demonstrando a alta especificidade do método de reação em cadeia da polimerase em relação àqueles.

A utilização da técnica de PCR para a detecção de bactérias no sistema biliar com *primers* universais, tem sido restrita ainda a poucos estudos. SWIDSINSKI, KHILKIN, PAHKIG, SWIDSINSKI e PRIEM, em 1998 realizaram estudo comparativo entre a cultura simples de cálculos biliares *versus* o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), provenientes de 100 pacientes com colelitíase crônica, colecistectomizados por videolaparoscopia. A cultura convencional foi positiva em apenas 9 casos. Onze amostras obtiveram PCR positiva com alta concentração de bactérias (10^4 a 10^5 unidades formadoras de colônias por microlitro – ufc/ μ l), 71 amostras obtiveram PCR positiva porém com baixa concentração de bactérias (10^3 ufc/ μ l) e apenas 9 casos com PCR negativa. Concluindo desta forma sobre a alta sensibilidade no método da PCR e que os achados de DNA bacteriano nos cálculos não são indicativos da presença de bactérias vivas.

HIRAMATSU, HARADA, TSUNEYAMA, SASAKI, FUJITA, HASHIMOTO, KANEKO, KOBAYASHI e NAKAMURA, no Departamento de Patologia da Universidade de Kanazawa no Japão, em 2000 realizaram um estudo para tentar detectar e identificar bactérias no fígado de pacientes com cirrose biliar primária em comparação com a colelitíase, mediante uso do método de PCR utilizando um *primer* bacteriano universal, o gene 16S rRNA. A positividade para a cirrose biliar primária foi de 75% contra apenas 5% da colelitíase ($p < 0,0001$).

2.8 ELETROFORESE

Eletroforese, do grego *elektronphorese* é uma técnica laboratorial amplamente utilizada no meio científico onde é aplicada uma corrente elétrica controlada com a finalidade de separar diversas moléculas orgânicas, como lipoproteínas, proteínas, RNA e DNA segundo sua massa e carga elétrica, através de uma matriz gelatinosa. Foi introduzida cientificamente em 1939 por Arne Tiselius e Elvin A. Kabat. (TISELIUS e KABAT, 1939)

Uma vez amplificando o segmento da molécula de DNA, este pode ser identificado mediante a técnica de eletroforese, que consiste no deslocamento de biomoléculas pela ação do campo elétrico na matriz sólida com gel de agarose ou poliacrilamida (ALBERTS, 1999; EÇA et al., 2004; FERREIRA, 2008).

Sob a influência da carga elétrica aplicada ao sistema, as diferentes moléculas migram através do gel com velocidades distintas, sendo que as moléculas menores (menor massa molecular) migram mais rapidamente em relação às maiores (maior massa molecular) no mesmo intervalo de tempo. O formato da molécula também influencia na migração (ALBERTS, 1999; PINHO, 2005).

A agarose é um polissacarídeo e forma uma rede que segura as moléculas durante a sua migração. Dependendo da concentração de agarose, têm-se uma diferença de gradiente de separação. Para preparar um gel de agarose, simplesmente faz-se a mistura entre o pó de agarose (1-3%) e uma solução tampão com pH definido. Após fundir, coloca-se brometo de etídeo, que fará o DNA “brilhar” quando exposto a luz ultra-violeta (FOX et al., 1995; ALBERTS, 1999; HO et al., 2000).

Sabendo-se que os segmentos de DNA amplificados apresentam carga elétrica negativa, provenientes do grupo fosfato, quando colocados sobre uma lâmina de gel na qual seja aplicada corrente elétrica, estas deverão migrar no sentido do pólo negativo para o pólo positivo. Neste caso a simples migração do fragmento de DNA amplificado através do gel, indicará a presença de DNA bacteriano na amostra. Para fins de comparação utiliza-se modelo padrão de peso molecular para identificar a banda de interesse, uma vez que padrões moleculares são feitos a partir de um DNA de fagos (vetores) com sítios enzimáticos conhecidos por tamanho molecular. O DNA padrão, quando corrido pela eletroforese, fornece escalas de tamanhos, por exemplo de 100 a 1000bp, onde a banda de interesse possui um tamanho conhecido

que é a distância de um *primer* a outro na seqüência dos nucleotídeos (FOX et al., 1995; FRANÇA, 1998; 1998; ALBERTS, 1999; HO et al., 2000; MATSUKURA et al., 2002; NERI et al., 2005).

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Oitenta e quatro pacientes oriundos de clínica privada, com idade média de 47,1 anos (13 – 88 anos) e de ambos os sexos (64 femininos e 19 masculinos), foram incluídos no estudo tendo sido diagnosticados como portadores de colecistite calculosa sintomática após história clínica e exame físico minuciosos, confirmados através de ultrassonografia abdominal.

Foram considerados como critérios de não inclusão a existência de quadros infecciosos agudos na via biliar (colecistite aguda calculosa, colangite) ou outros associados; quadros obstrutivos com ou sem icterícia recente ou na história pregressa (coledocolitíase, obstrução por doença neoplásica ou benigna) pacientes diabéticos ou imunodeprimidos e uso de antibióticos por duas semanas anteriores ao procedimento cirúrgico.

Todos os pacientes foram submetidos a colecistectomia videolaparoscópica no Centro Hospitalar UNIMED, em Joinville, no período compreendido entre junho de 2006 e junho de 2007 (APÊNDICE I). Todas as vesículas resultantes das cirurgias foram encaminhadas para o estudo anatomo-patológico.

Todos os pacientes foram conscientizados e formalmente autorizaram, por escrito, a realização dos exames pertinentes para este estudo (APÊNDICE II).

Este estudo recebeu parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal São José, Joinville – SC (ANEXO I).

3.2 PRÉ-OPERATÓRIO

Os pacientes foram todos avaliados pelos médicos cirurgiões do serviço de cirurgia do Centro Hospitalar Unimed, com solicitação de exames de pré-operatórios após a confirmação do diagnóstico de colecistite calculosa sintomática e indicação formal da cirurgia. Neste momento solicitou-se formalmente a participação do paciente no estudo em questão.

Como de rotina todos os pacientes foram reavaliados clinicamente pelo Serviço de Anestesiologia de Joinville antes de serem internados e seguiram as seguintes orientações de jejum e medicação pré-anestésica.

3.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Conforme protocolo do Serviço de Anestesiologia de Joinville, foi realizada anestesia geral balanceada para o procedimento de colecistectomia videolaparoscópica (APÊNDICE III).

Início da anestesia com pré-oxigenação com O₂ a 100% por 3 a 5 minutos, indução anestésica com hipnótico: Propofol (Lipuro® 1%, B/Braum) 2mg/Kg/peso; opióide: Citrato de fentanila (Fentanest® 0,0785mg/ml, Cristália) 5mg/Kg/peso; relaxante muscular: Besilato de Cisatracúrio (Nimbiun® 10mg/5ml, Glaxo) 0,15mg/Kg/peso, além de Sevoflurano 2% (Sevorane® 1ml/ml, Abbott) e oxigênio.

Realizou-se intubação orotraqueal e posterior administração de antibioticoterapia profilática com Cefazolina Sódica (Kefazol®, 1g, ABL)

Manutenção anestésica com Sevoflurano 2% (Sevorane® 1ml/ml, Abbott) e oxigênio até o término do procedimento cirúrgico.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Utilizou-se Aparelho de Videolaparoscopia Storz (Karlstorz – Endoscope : Themoflator – 264320 20, Xenon 300 – 201331 20, Telecam SL NTSC – 202121 20, Telecan C NTSC – 202121 34, Monitor Sony – PVM 20N6V)

A cirurgia iniciou-se com incisão peri-umbelical e introdução de agulha de Verres para confecção do pneumoperitônio com CO₂, seguido de introdução de *trocater* de 12mm (Endopath XCEL, Ethicon®) para ser utilizado pela ótica de 30º.

Sob visão direta, introduziram-se mais dois *trocater*s de 5mm de diâmetro (*trocater*s permanentes) na linha axilar anterior e região subcostal na linha clavicular média, respectivamente para a tração da vesícula biliar e auxílio na dissecação da mesma. Outro *trocater* de 12mm (Endopath XCEL.Ethicon®) foi introduzido na região sub-xifoidéia.

Após inspeção da cavidade abdominal realizou-se a punção da vesícula biliar, em alguns casos optou-se por aspiração da bile no final da cirurgia, no momento de

tração da mesma até a parede abdominal ou ainda após a sua completa retirada da cavidade abdominal.

Após aspiração da bile iniciava-se a dissecação do hilo da vesícula biliar com clipagem da artéria cística e do ducto cístico. A dissecação da vesícula foi realizada de forma retrógrada com utilização de pinça especial tipo “ganchinho ou *hook*” associado ao eletrocautério.

Revisada então a hemostasia, retirou-se a vesícula pela incisão do trocater de 12mm peri-umbelical (APÊNDICE IV). Em todos os casos o autor se fez presente no ato cirúrgico, ou como cirurgião principal, ou como auxiliar.

3.5 COLETA DA BILE

Foi aspirado em todos os casos volume de aproximadamente 20 ml de bile contida na vesícula biliar. Esta aspiração foi realizada através de punção da vesícula biliar ainda no seu leito hepático; logo após sua tração até a parede abdominal, ou após a sua completa retirada da cavidade abdominal. O volume aspirado de 20ml foi separado em dois frascos estéreis com 10 ml cada e enviados, no mesmo dia, para os laboratórios para pesquisa de DNA bacteriano e cultura automatizada, respectivamente (FIGURA 2).

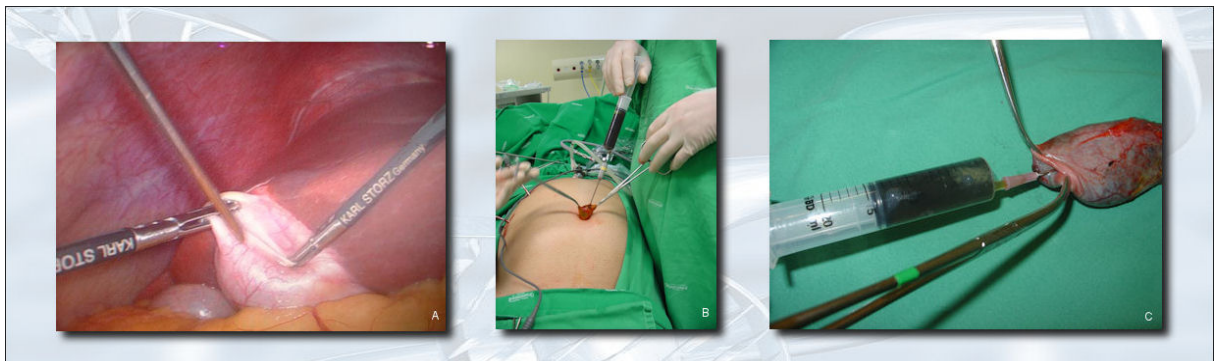


FIGURA 2 - COLETA DE BILE

FONTE: O autor (2008)

NOTA: A: Coleta de bile com vesícula no leito hepático; B: Coleta de bile durante tração da vesícula na parede abdominal e C: Coleta de bile com vesícula na mesa cirúrgica.

3.6 CULTURA DA BILE

A pesquisa da presença de bactérias através de cultura convencional automatizada foi realizada sob orientação dos bioquímicos do Laboratório de Análises Clínicas do CENTRO HOSPITALAR UNIMED - CHU, em Joinville – SC (APÊNDICE V).

O meio de cultivo utilizado para a realização das culturas de bile, foi o *Aerobic Blood Culture Media* ou BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), sem inibidor de antibióticos, que possui em seu interior sensor colorimétrico de cor verde e que tem sua cor alterada na presença de Dióxido de Carbono, produzido pelo crescimento bacteriano (FIGURA 3).



FIGURA 3 - FRASCO DE CULTURA DE BILE BacT/ALERT® SA

Procedeu-se à inoculação de 10 ml da amostra, no frasco com meio de cultura sob técnica asséptica e em câmara de fluxo laminar (FIGURA 4).



FIGURA 4 - CULTURA DE BILE

NOTA: A e B: Procedimento de inoculação da bile nos frascos de cultura BacT/ALERT® SA em câmara de fluxo de ar.

Após a inoculação, os frascos foram homogeneizados manualmente, incubados e processados automaticamente no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), durante 05 dias a 37°C (FIGURA 5).



FIGURA 5 - INCUBAÇÃO DOS FRASCOS DE CULTURA DE BILE

NOTA: A, B e C: Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), para 120 frascos

Após o quinto dia de incubação, caso não fosse detectada a produção de Dióxido de Carbono no interior dos frascos de cultura, o equipamento BacT/ALERT®

SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) produzia, em sua tela, um aviso de que no seu interior havia um frasco de cultura Negativo.

Ao abrir a porta do gabinete de incubação do equipamento BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) uma luz verde acendia-se ao lado do frasco indicando que aquele frasco não teve crescimento bacteriano.

Se durante os 05 dias de incubação houvesse crescimento bacteriano, o sensor permeável a gases existentes no fundo do frasco alterava sua cor de azul esverdeado para amarelo, o que era detectado pelo BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), o qual emitia um sinal sonoro e um aviso na tela do equipamento de que havia um frasco Positivo dentro do equipamento (FIGURA 6).

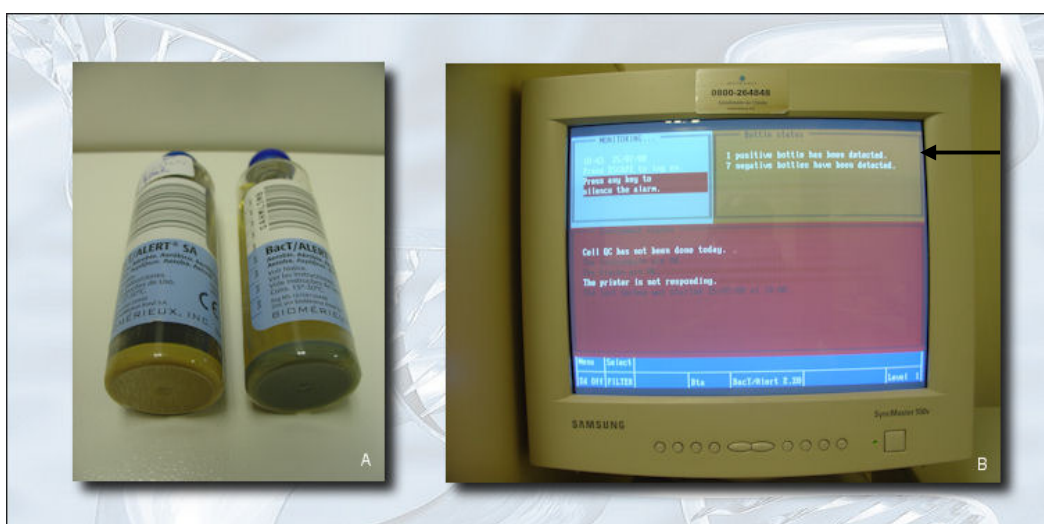


FIGURA 6 - FRASCOS DE CULTURA COM AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS

NOTA: A: Alteração da cor do sensor permeável a gases, existente no fundo do frasco de cultura, de azul esverdeado, à direita (cultura negativa) para amarelo, à esquerda (cultura positiva); B: Sinalização na tela do computador da presença de frascos positivos e negativos (seta negra).

Nas amostras positivas foram realizados testes microbiológicos para identificação do microorganismo através da semeadura nos meios de cultura Agar Sangue de Carneiro, para crescimento de organismos gram positivos e Agar MacConkey, para isolamento de gram negativos (FIGURA 7).

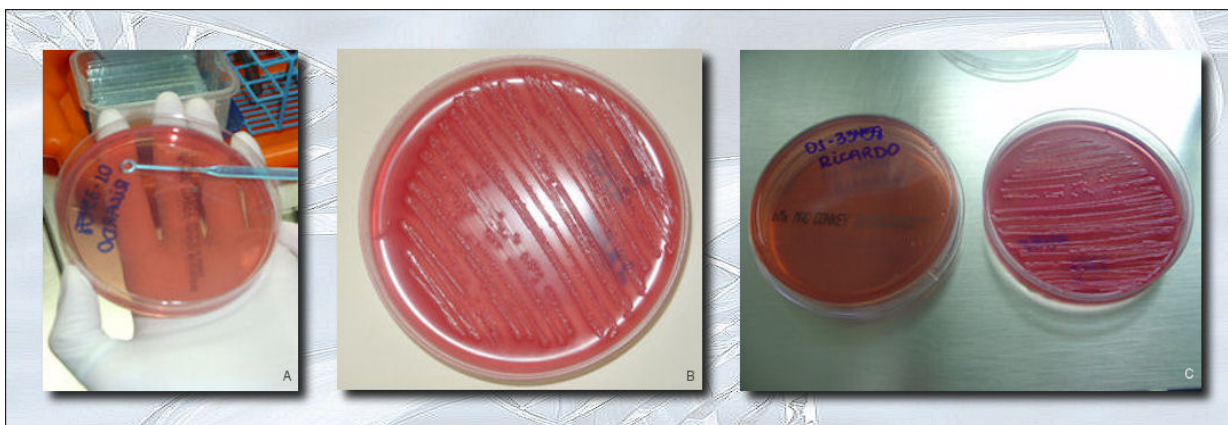


FIGURA 7 - SEMEADURA NOS MEIOS DE CULTURA AGAR SANGUE DE CARNEIRO E AGAR MACCONKEY, PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

NOTA: A, B e C: Semeadura em meios de cultura tipo placas sólidas.

As placas foram incubadas a 37°C em tensão normal de oxigênio durante 24 horas, e após o crescimento das colônias, foram realizadas as provas de identificação com base nas características de crescimento macroscópico.

3.7 PESQUISA DO DNA BACTERIANO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE (Universidade da Região de Joinville) e incluiu as seguintes etapas:

3.7.1 Extração do DNA

A técnica utilizada para a extração do DNA em todas as 84 amostras foi a do Fenol-Clorofórmio, seguindo os seguintes passos e protocolo proposto pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE (APÊNDICE VI).

Utilizou-se 100 microlitros (μ l) de bile em tubos de Eppendorf de 1,5 ml, adicionados 400 microlitros de tampão de extração/lise (10mM Tris-HCl pH 7,4; 10mM NaCl; 25 μ M EDTA) (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA); e 1% Dodecil Sulfato de Sódio (*UltraPure™ Sodium Dodecyl Sulfate*, Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) além de Proteinase K na concentração de

10 µg/ml (*Protein kinases*, Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) (FIGURA 8).

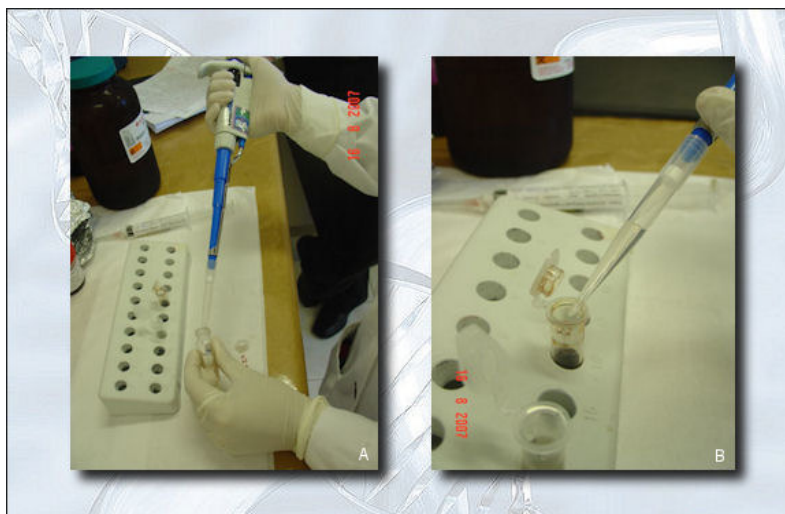


FIGURA 8 - TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA FENOL-CLOROFÓRMIO

NOTA: A e B: Adição de proteinase K para a lise proteica da membrana celular, nos tubos de Eppendorf contendo a amostra de bile.

A solução foi agitada suavemente por 10 minutos no agitador Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NY, EUA) e incubada a 37°C *overnight* para a completa realização da *lise* protéica da membrana celular (FIGURA 9).



FIGURA 9 - AGITADOR VORTÉX GENIE 2

NOTA: A e B: Homogeneização da amostra antes de incubação *overnight*.

Na manhã seguinte, adicionou-se igual volume de Fenol neutralizado (UltraPure™ Phenol, Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA), homogeneizado novamente no agitador Vortex e centrifugado na microcentrifuga

(Eppendorf AG, Centrifuge® 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 1300 rpm por 10 minutos (FIGURA 10).



FIGURA 10 - MICROCENTRÍFUGA EPPENDORF AG, CENTRIFUGE® 5415 R

NOTA: A e B: Centrifugação da amostra de bile com solução de Fenol neutralizado.

O sobrenadante foi então transferido para outro tubo e acrescentado 500µl de solução de Fenol e Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1) (UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1), Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA), homogeneizado e centrifugado.

Nas fases seguintes para a precipitação do DNA genômico foram adicionados 1/10 do volume do sobrenadante de Acetato de Sódio 3M, pH 5,2 (LabMaster Ltda, Curitiba, Brasil) e 1500 µl de Etanol absoluto gelado. O tubo foi incubado a -20°C , *overnight*.

Foi centrifugado na microcentrífuga (Eppendorf AG, Centrifuge® 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 4°C, por 10 minutos a 13.000rpm e em seguida realizadas duas lavagens com etanol 70% gelado para retirada de excesso de material orgânico e secagem em bancada por mais 12hs em temperatura ambiente (FIGURA 11).



FIGURA 11 - PRECIPITADO DE DNA GENÔMICO NOS TUBOS DE EPPENDORF

NOTA: A: Tubo de Eppendorf com sobrenadante de solução de Fenol e Clorofórmio-Álcool Isoamílico; B e C: Precipitado de DNA genômico pós microcentrifugação e lavagem com etanol 70% gelado.

Para finalizar o processo, o DNA foi eluído em 25 μ l de tampão TE (Tris-HCL 10mM e EDTA 10 μ M, pH 8,0) (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA)

3.7.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

As reações de PCR, usadas para a amplificação da sequência correspondente ao RNA ribossomal subunidade 16S foram feitas com as seguintes condições (APÊNDICE VII). Foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, Massachusetts, EUA) (FIGURA 12).



FIGURA 12 - TERMOCICLADOR PTC-100

Confecção de solução (*mix*) constituída de *Ne Buffer* 10x – solução tampão (5mM KCl, 1mM Tris-HCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂) , 0,5mM MgCl₂ que é um sal cofator da *Taq polimerase* (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia,EUA) , 0,2mM dNTP's (nucleotídeos livres), 20 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores :
 # Com1 (5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3') e # Com2 (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3') (FIGURA 13).



FIGURA 13 - OLIGONUCLEÓTÍDEOS INICIADORES

NOTA: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) Com 1 e Com2 que sob a ação da *Taq Polimerase* irão iniciar o processo de extensão.

A esta solução foi acrescentado 1U/μl (unidades por microlitro) de *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia,EUA) para a ligação dos nucleotídeos livres com os nucleotídeos do DNA alvo e 5U/μl da enzima de restrição *Alu I* (New England *BioLabs*, Massachusetts, EUA) (FIGURA 14).



FIGURA 14 - *PLATINUM TAQ DNA POLIMERASE*,
SOLUÇÃO TAMPÃO E $MgCl_2$

Essa reação foi incubada a 37°C por 2 horas e inativada por 20 minutos a 65°C.

Adicionou-se 3,0µl de DNA a ser amplificado proveniente da técnica de extração pelo fenol/clorofórmio.

A ativação da enzima *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) ocorreu a 94°C por 3 minutos e a amplificação ocorreu em 35 ciclos, onde cada ciclo consistiu de:

- desnaturação: 1 minuto a 94°C;
- “annealing” ou anelamento ou hibridização ou pareamento (fixação dos *primers* no DNA alvo): 1 minuto a 55°C ;
- extensão: 1 minuto e 30 segundos a 72°C;
- seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos (FIGURA 15).

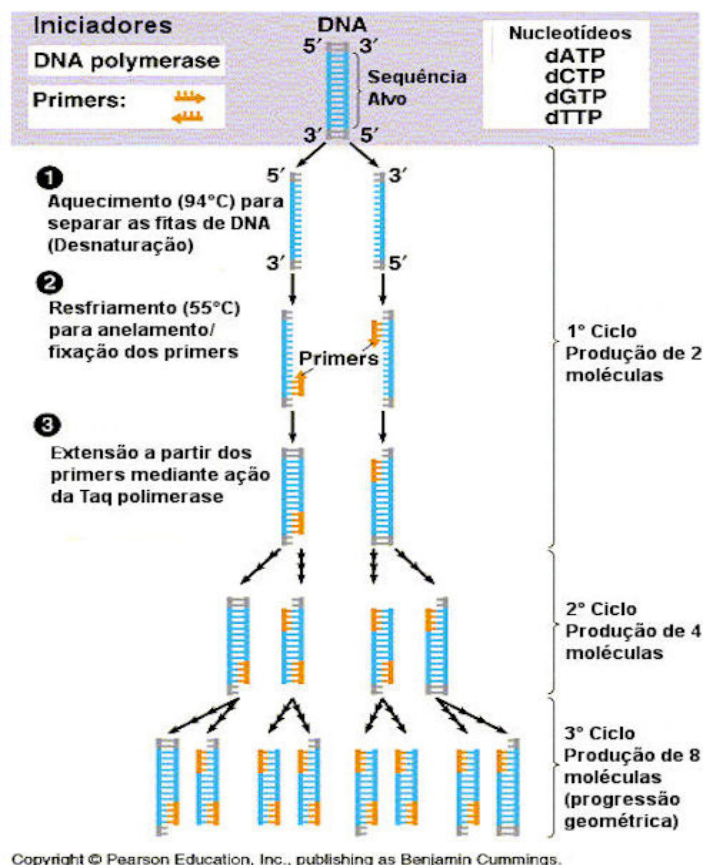


FIGURA 15 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

FONTE: www.pseudomonas-syriangae.org/images/PCR.gif(Copyright© Pearson Education. Inc., Benjamin Cummings)
– consultado dia 23/08/2008

| Ciclo | Moléculas | Ciclo | Moléculas | Ciclo | Moléculas |
|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|
| 1 | 2 | 10 | 1024 | 19 | 524288 |
| 2 | 4 | 11 | 2048 | 20 | 1048576 |
| 3 | 8 | 12 | 4096 | 21 | 2097152 |
| 4 | 16 | 13 | 8192 | 22 | 4194304 |
| 5 | 32 | 14 | 16384 | 23 | 8388608 |
| 6 | 64 | 15 | 32768 | 24 | 16777216 |
| 7 | 128 | 16 | 65536 | 25 | 33554432 |
| 8 | 256 | 17 | 131072 | 26 | 67108864 |
| 9 | 512 | 18 | 262144 | 27 | 134217728 |

QUADRO 1: SIMULAÇÃO DE AMPLIFICAÇÕES PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

FONTE: PINHO, 2005

NOTA: Amplificação de uma molécula de DNA, em progressão geométrica, até o ciclo 27 (27X).

3.7.3 Eletroforese

O produto resultado da amplificação pela PCR (*amplicons*) de aproximadamente 410bp (pares de bases) foi corrido em gel 1% de agarose por 1 hora na cuba de eletroforese (HORIZON® 11-14, Life Technologies – GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, GAITHERSBURG – USA) a 100Volts proveniente de uma fonte de eletroforese (*PHARMACIA*, Eletrophoresis Power Supply EPS – 3500 XL, SEMKO, USA) e corado na presença do corante intercalante brometo de etídio. A visualização foi realizada pelo sistema de foto documentação (Bio – Imaging Systems, MINI BIS PRO) sob luz ultravioleta (APÊNDICE VIII) (FIGURAS 16,17,18 e 19).



FIGURA 16 - ELETROFORESE



FIGURA 17 - CUBA DE ELETROFORESE

NOTA: A: Gel de agarose na cuba de eletroforese; B e C: Confecção de *slots* (poços) no gel para os *amplicons*.

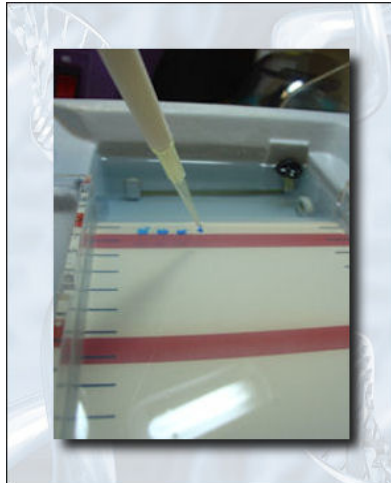


FIGURA 18 - AMPLICONS CORADOS COM AZUL DE BROMOFEROL E DEPOSITADOS NOS SLOTS DO GEL DE AGAROSE

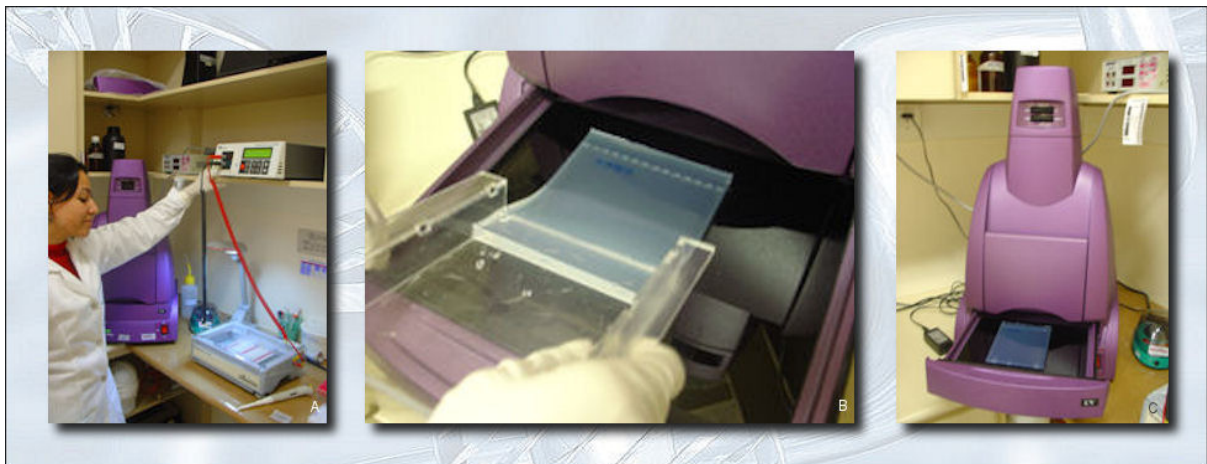


FIGURA 19 - APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA NO GEL PARA MIGRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE DNA DO PÓLO NEGATIVO PARA O PÓLO POSITIVO

NOTA: A: Aplicação de corrente elétrica no gel de agarose; B e C: Colocação do gel no sistema de foto documentação sob luz ultravioleta.

O surgimento de bandas na placa de gel de agarose foi indicativo da presença de DNA (FIGURAS 20 e 21).

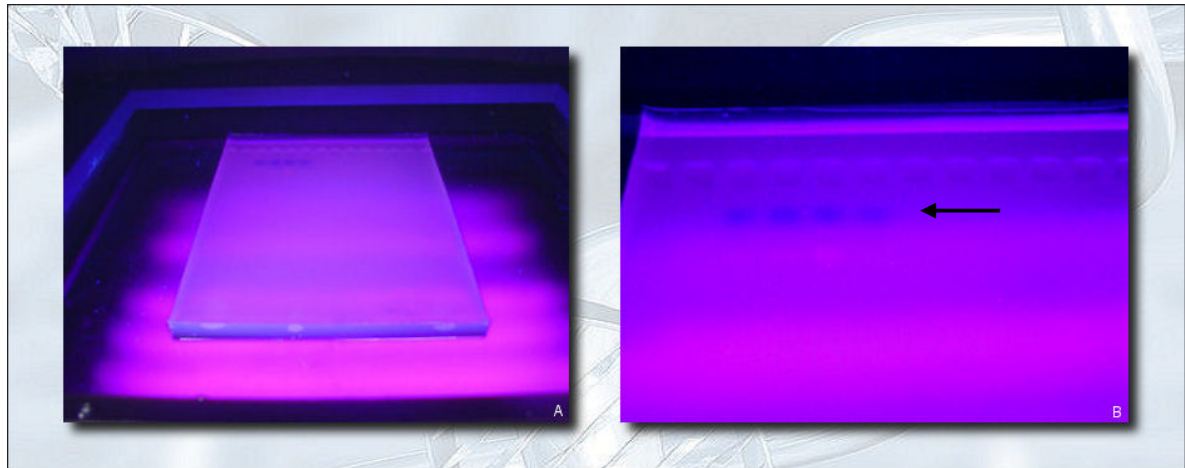


FIGURA 20 - GEL DE AGAROSE

NOTA: A e B: Gel de agarose a 1% com *amplicons* corados, dentro dos *slots*, no sistema de foto documentação sob luz ultravioleta (seta negra).

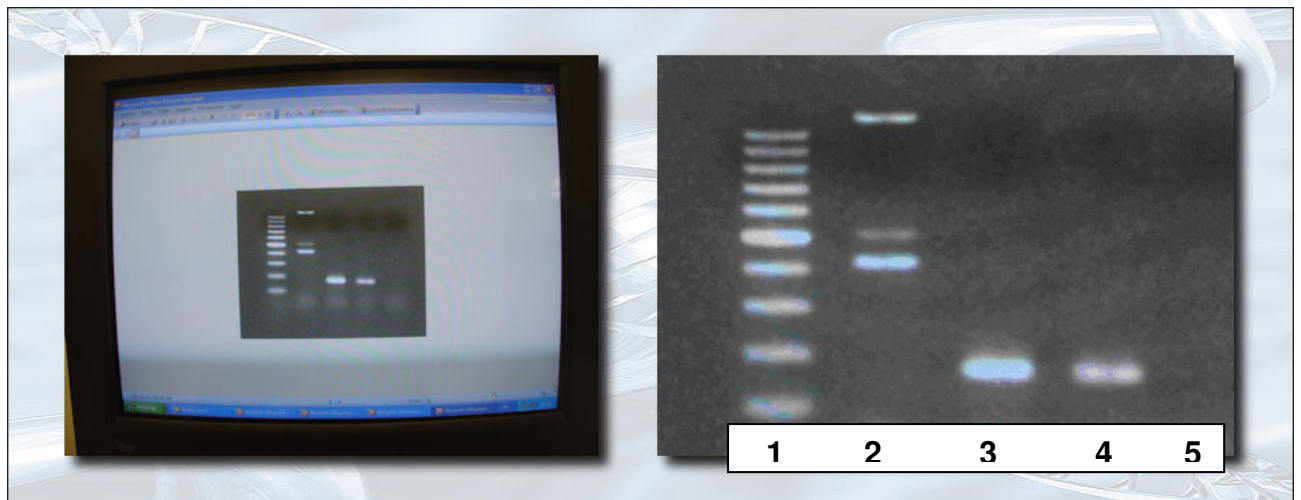


FIGURA 21 - SISTEMA DE FOTO DOCUMENTAÇÃO (BIO - IMAGING SYSTEMS, MINI BIS PRO)

NOTA: A: Visibilização das bandas na placa de gel pelo sistema de foto documentação (Bio - Imaging Systems , MINI BIS PRO); B: Amostra 1) Padrão de peso molecular, amostra 2) reação com banda inespecífica, amostra 3) reação com banda positiva, amostra 4) reação com banda positiva, amostra 5) reação com banda negativa.

3.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA

Todos os pacientes foram acompanhados com visitas no 1º, 10º. e 30º. dias de pós-operatório com o intuito de identificar possíveis complicações em ferida operatória e/ou sistêmicas.

Foram avaliados de acordo com classificação proposta pelo US Center for Disease Control and Prevention (CDC) de 1992 e complementado com dados modificados por CUTTING e HARDING em 1994 e revisados em 2005 por CUTTING e WHITE, além da Portaria 930 de 27 de agosto de 1992 do Ministério da Saúde do Brasil.

A ferida foi considerada infectada, caso pelo menos um dos sinais clássicos de infecção fossem identificados, até 30 dias do procedimento cirúrgico: dor, calor, edema, rubor e celulite, além de complementados com outros critérios, com a presença de pelo menos um dos seguintes sinais:

- a) secreção purulenta no sítio cirúrgico;
- b) secreção purulenta da ferida operatória ou do dreno locado na ferida;
- c) retardo na cicatrização;
- d) descoloramento da ferida operatória;
- e) tecido de granulação friável e que sangrasse com facilidade;
- f) odor anormal da ferida operatória;
- g) presença de linfangite;
- h) decomposição da ferida operatória;
- i) formação de bolhas na ferida operatória.

Identificado o processo infeccioso a ferida foi classificada em:

- a) Infecção superficial: restrita à pele e subcutâneo, não havendo envolvimento de qualquer tecido manipulado durante o procedimento cirúrgico e que não estivesse localizado abaixo da fáscia muscular;
- b) Infecção profunda: localizada abaixo da fáscia muscular, com ou sem envolvimento de tecidos superficiais, e ausência de comprometimento de órgão ou cavidades profundas, manipuladas durante o procedimento cirúrgico;

- c) Infecção de órgãos ou cavidades: acometendo tecidos profundos, manipulados durante a operação, com ou sem envolvimento da incisão cirúrgica.

Secreção da ferida, se presentes, foram colhidas de forma asséptica e enviadas para cultura.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das variáveis quantitativas (idade e tempo cirúrgico) foram expressas em médias e desvio padrões e os resultados das variáveis qualitativas (sexo, anatomia-patológica, resultado das culturas e PCR) foram expressos em frequência e percentuais

Para avaliação do grau de associação entre cultura simples e reação em cadeia da polimerase – PCR, foi considerado o coeficiente Phi, para análise da associação entre as duas técnicas. No que diz respeito à relação entre os achados anátomo-patológicos e a positividade nas duas técnicas, foi considerado o teste exato de Fisher.

Foi considerado intervalo de confiança de 95% para o percentual de concordância entre as duas técnicas. Para comparação da positividade entre os dois métodos, foi considerado o teste binomial. Para os testes estatísticos, valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4 RESULTADOS

Foram realizadas colecistectomias videolaparoscópicas em 84 pacientes com diagnóstico de colecistopatia crônica calculosa sintomática, que procuraram os consultórios dos cirurgiões do Serviço de Cirurgia Geral e Digestiva do Centro Hospitalar Unimed - CHU, de Joinville/SC.

4.1 IDADE

A idade dos pacientes variou de 13 até 88 anos. A média de idade foi de 47,14 anos com desvio padrão de 14,42 anos, tendo como faixa etária predominante a quarta década (27,38%) (GRÁFICO 1).

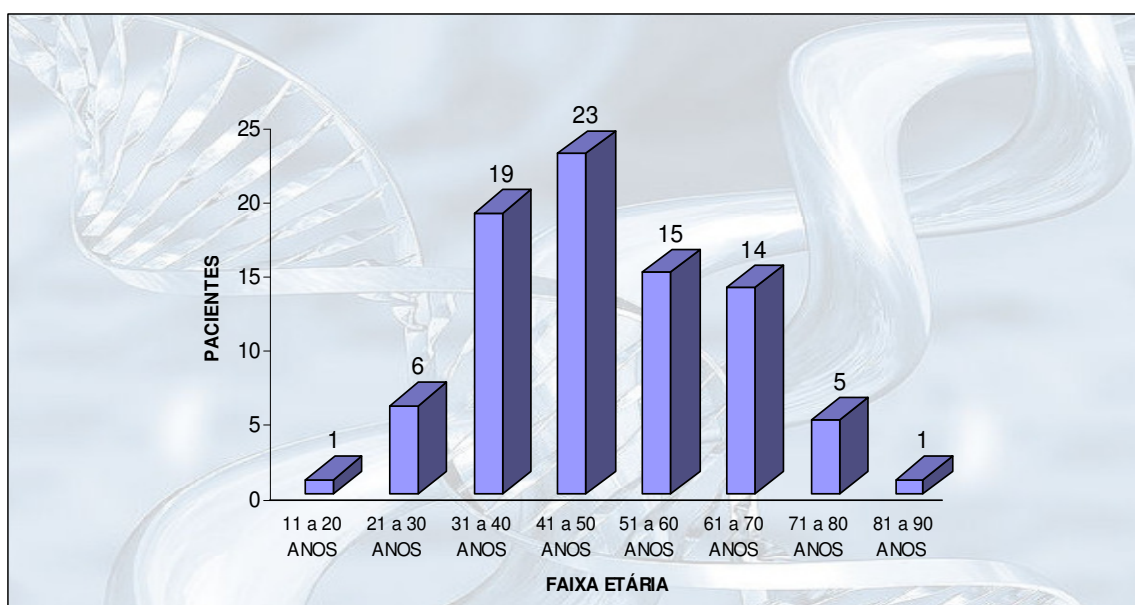


GRÁFICO 1 - NÚMERO DE PACIENTES POR FAIXA ETÁRIA

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Relação entre idade e nº de pacientes. Média de 47,14 ± 14,42 anos.

4.2 SEXO

Dos 84 pacientes operados, 65 eram do sexo feminino, perfazendo 77,38 % dos casos, e 19 do sexo masculino, sendo equivalente a 22,61% de todos os pacientes operados.

4.3 TEMPO OPERATÓRIO

O tempo operatório variou de 32 minutos a 175 minutos, com média de 60,99 \pm 21,41 minutos, contados a partir do momento da incisão na pele para a realização do pneumoperitônio até a sutura da pele no final da cirurgia.

4.4 COMPLICAÇÕES DE FERIDAS OPERATÓRIAS

Após reavaliação de todos os pacientes, não foi observado nenhum caso de complicação em feridas cirúrgicas no pós-operatório, bem como não foi observado nenhum caso de óbito na amostra estudada.

4.5 CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE

Em todas as culturas foi utilizado o frasco *Aerobic Blood Culture Media* ou BacT/ALERT® SA sem inibidor de antibióticos, com um sensor colorimétrico de Dióxido de Carbono.

Nas culturas automatizadas de bile observou-se positividade em 16 casos, num total de 19,05%, e em 68 pacientes foi obtido resultado negativo (80,95%), vide GRÁFICO 2.

As bactérias encontradas foram: *Escherichia coli*, (5 amostras), *Klebsiella* e *Staphylococcus*, em quatro pacientes cada, seguido pela *Pseudomonas* (2 pacientes) e o *Streptococcus* e *Enterobacter*, cada um em apenas um paciente.

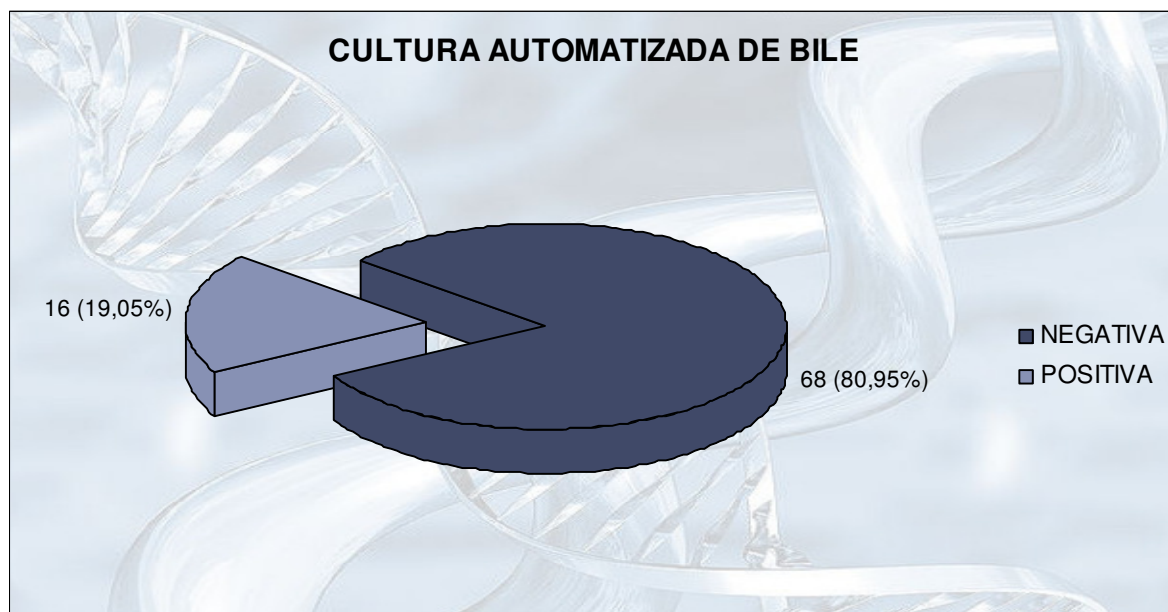


GRÁFICO 2 - CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE

NOTA: Relação entre cultura automatizada e nº de pacientes.

4.6 PESQUISA DE DNA BACTERIANO POR PCR

A pesquisa do DNA bacteriano pelo método de reação em cadeia da polimerase – PCR mostrou-se negativa em 42 casos (50%) e positiva também em 42 casos (50%) (TABELA 1).

TABELA 1 - PESQUISA DE DNA BACTERIANO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | N | (%) |
|------------------------------------------|----|-----|
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR (+) | 42 | 50 |
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR(-) | 42 | 50 |

FONTE: O autor (2008)

NOTA: Relação entre reação em cadeia da polimerase - PCR e N = nº de pacientes.

4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR VS CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE

Na tabela abaixo, são apresentados os resultados obtidos no estudo.

TABELA 2 - RESULTADO DAS AMOSTRAS EM ESTUDO

| CULTURA | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | | Total |
|----------|--------------------------------------|----------|-------|
| | NEGATIVO | POSITIVO | |
| NEGATIVO | 35 | 33 | 68 |
| POSITIVO | 7 | 9 | 16 |
| Total | 42 | 42 | 84 |

NOTA: Relação entre o resultado dos métodos em estudo e nº de pacientes.

Dos 84 casos avaliados, observou-se a concordância entre as duas técnicas em 44 amostras (52,38%).

O coeficiente Phi obtido no estudo foi igual a 0,06. Este resultado, embora não possa demonstrar a associação entre as duas técnicas, não é suficiente para rejeita-la estatisticamente ($p=0.781$).

Este achado pode ser confirmado pela demonstração da positividade de 42 (50%) e 16 (19%) casos analisados pelos métodos de PCR e cultura, respectivamente ($p<0.001$).

Conforme observado no GRÁFICO 3, ambos os métodos demonstraram resultados negativos coincidentes em 35 pacientes (41,6%) enquanto em nove casos ambos demonstraram positividade (10,7%).

Entre os resultados não coincidentes, observou-se uma positividade para a presença de DNA bacteriano na bile de 33 pacientes cuja cultura foi negativa, enquanto em sete casos a análise pela reação em cadeia da polimerase – PCR não confirmou as culturas positivas encontradas.

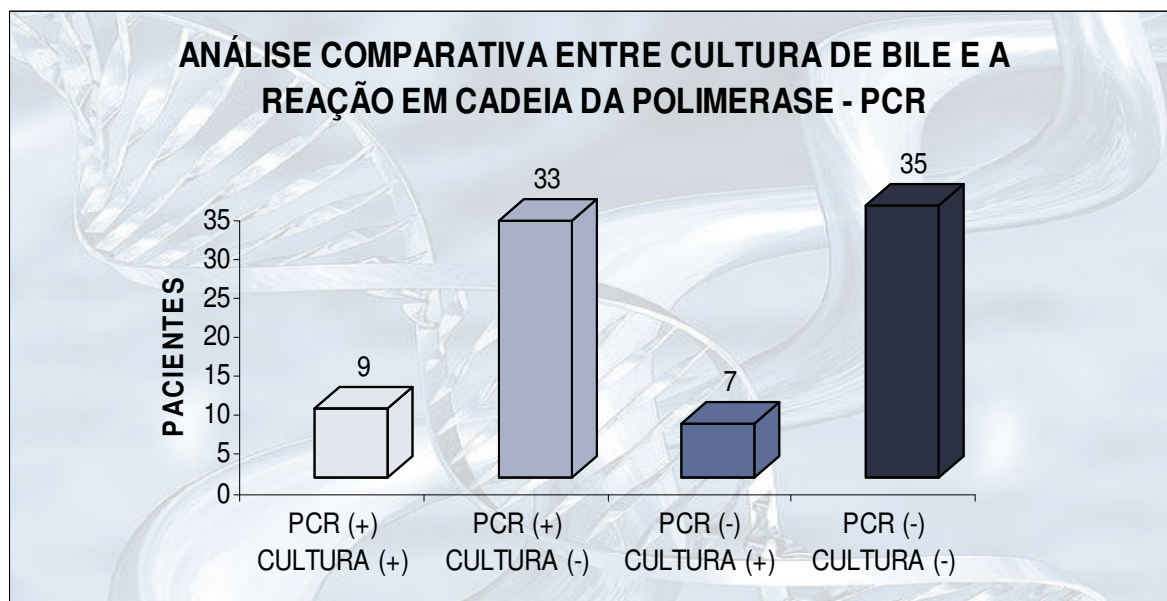


GRÁFICO 3 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CULTURA DE BILE E A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

NOTA: Relação entre os métodos em estudo e o nº de pacientes.

4.8 RESULTADO ANATOMIA PATOLÓGICA

Conforme protocolo previamente estabelecido, somente foram incluídos no estudo aqueles pacientes com diagnóstico clínico e ultrassonográfico de colecistite crônica calculosa, porém o resultado dos estudos anatomo-patológicos demonstraram 82,2% dos casos (69 pacientes) de colecistite crônica calculosa e 17,8% (15 pacientes), de colecistite crônica calculosa agudizada, apesar de visualmente, durante realização do procedimento cirúrgico, possuírem o aspecto macroscópico de doença crônica sem sinais evidentes de reagudização (TABELA 3).

TABELA 3 - RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA

| PATOLOGIA | FREQÜÊNCIA | (%) |
|-----------------------------------------|------------|--------|
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA | 69 | 82,14 |
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA AGUDIZADA | 15 | 17,86 |
| TOTAL | 84 | 100,00 |

A TABELA 4 demonstra a relação da técnica da reação em cadeia da polimerase - PCR vs cultura de bile nos 15 casos de colecistite crônica calculosa agudizada.

TABELA 4 - RELAÇÃO ENTRE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR VS CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE NA COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA AGUDIZADA

| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | CULTURA | N | (%) |
|------------------------------------------|-------------|---|-----|
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR (+) | CULTURA (+) | 3 | 20 |
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR(+) | CULTURA (-) | 6 | 40 |
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR(-) | CULTURA (+) | 3 | 20 |
| REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR(-) | CULTURA (-) | 3 | 20 |

NOTA: Relação entre a técnica de reação em cadeia da polimerase vs cultura automatizada na colecistite crônica calculosa agudizada, N= nº de pacientes (15 pacientes).

O GRÁFICO 4 demonstra a relação entre a técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR vs a cultura de bile para os 69 casos de colecistite crônica calculosa.

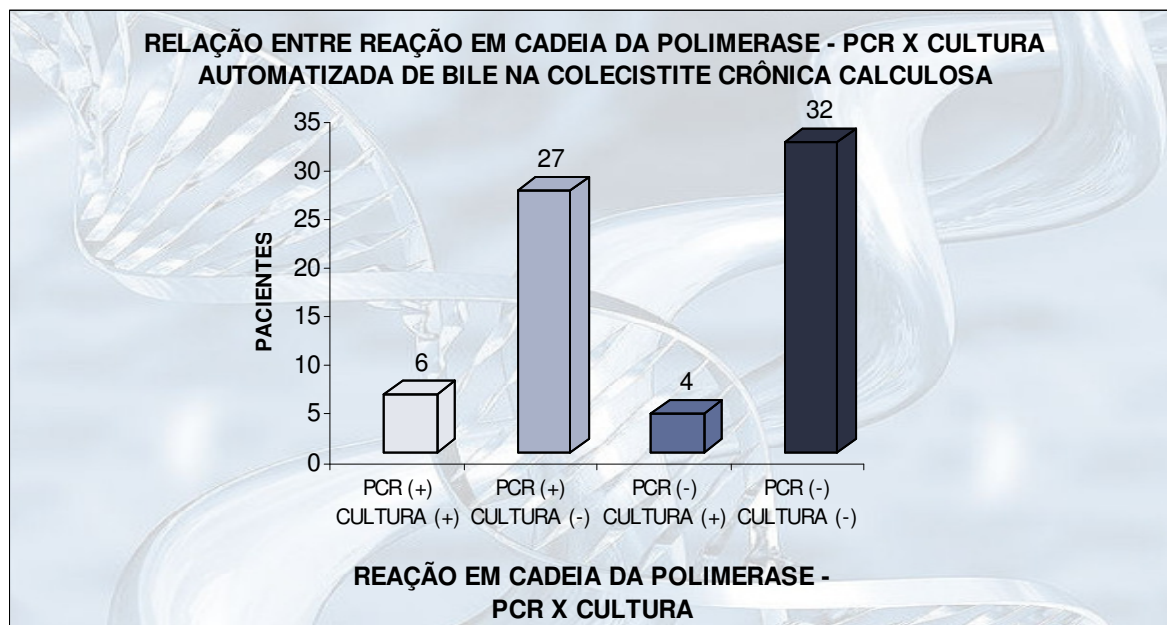


GRÁFICO 4 - RELAÇÃO ENTRE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR VS CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE NA COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA

NOTA: Relação entre a técnica de reação em cadeia da polimerase vs cultura automatizada na colecistite crônica calculosa (69 pacientes).

4.9 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE PATOLOGIA E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS

4.9.1 Análise dos resultados da anatomia patológica vs cultura automatizada

Na TABELA 5, são apresentados os resultados obtidos no estudo.

TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA VS CULTURA AUTOMATIZADA

| PATOLOGIA | | CULTURA | | Total |
|-----------------------------------------|------|-------------|-------------|-------|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | |
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA | N(%) | 59 (85,51%) | 10 (14,49%) | 69 |
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA AGUDIZADA | N(%) | 9 (60%) | 6 (40%) | 15 |

NOTA: Relação entre o resultado da anatomia-patológica e a cultura automatizada.

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as positivities das culturas automatizadas em pacientes portadores de colecistite crônica calculosa agudizada e não agudizada, com predominância para àquelas ($p=0.033$).

4.9.2 Análise dos resultados da anatomia patológica vs reação em cadeia da polimerase - PCR

Na tabela abaixo, são apresentados os resultados obtidos no estudo.

TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

| PATOLOGIA | | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR | | Total |
|-----------------------------------------|-------|--------------------------------------|-------------|-------|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | |
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA | N (%) | 36 (52,17%) | 33 (47,83%) | 69 |
| COLECISTITE CRÔNICA CALCULOSA AGUDIZADA | N(%) | 6 (40%) | 9 (60%) | 15 |

NOTA: Relação entre o resultado da anatomia-patológica e a reação em cadeia da polimerase - PCR.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os índices de positividade obtidos em pacientes portadores de colecistite crônica calculosa agudizada e não agudizada, mediante análise por PCR ($p=0,570$)

4.10 RELAÇÃO ENTRE IDADE E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS

A avaliação através de cultura demonstrou positividade para a presença de bactérias na bile significativamente maior entre pacientes acima de 60 anos quando comparados àqueles abaixo desta idade ($p=0.018$). Por outro lado, a mesma análise realizada pela técnica de PCR não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($p= 1,00$) (GRÁFICOS 5 e 6).

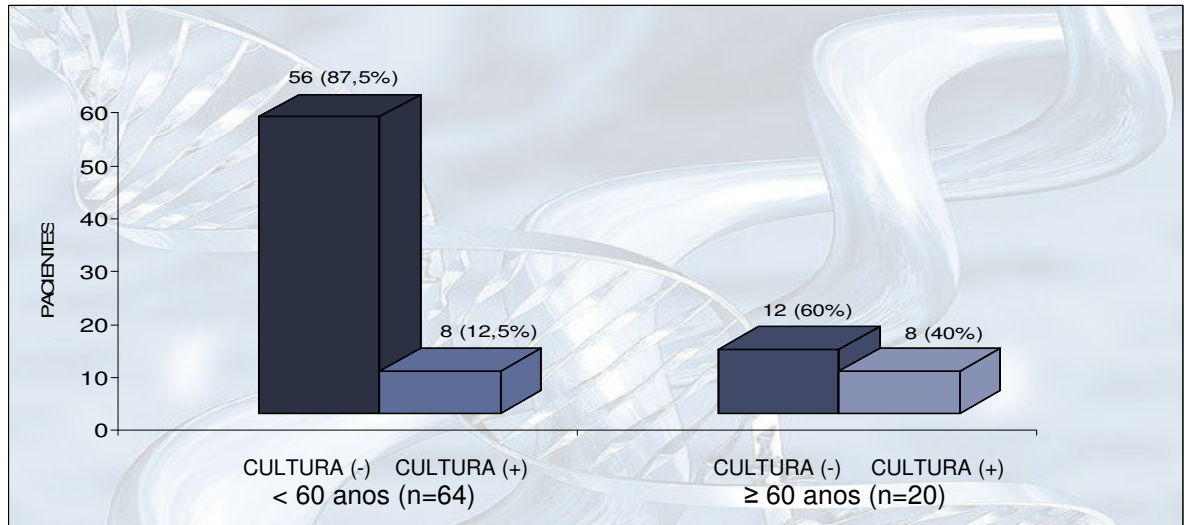


GRÁFICO 5 - RELAÇÃO ENTRE A IDADE VS A CULTURA AUTOMATIZADA

NOTA: Relação entre a positividade da amostra na técnica de cultura automatizada e a idade acima e abaixo de 60 anos ($p=0,018$).

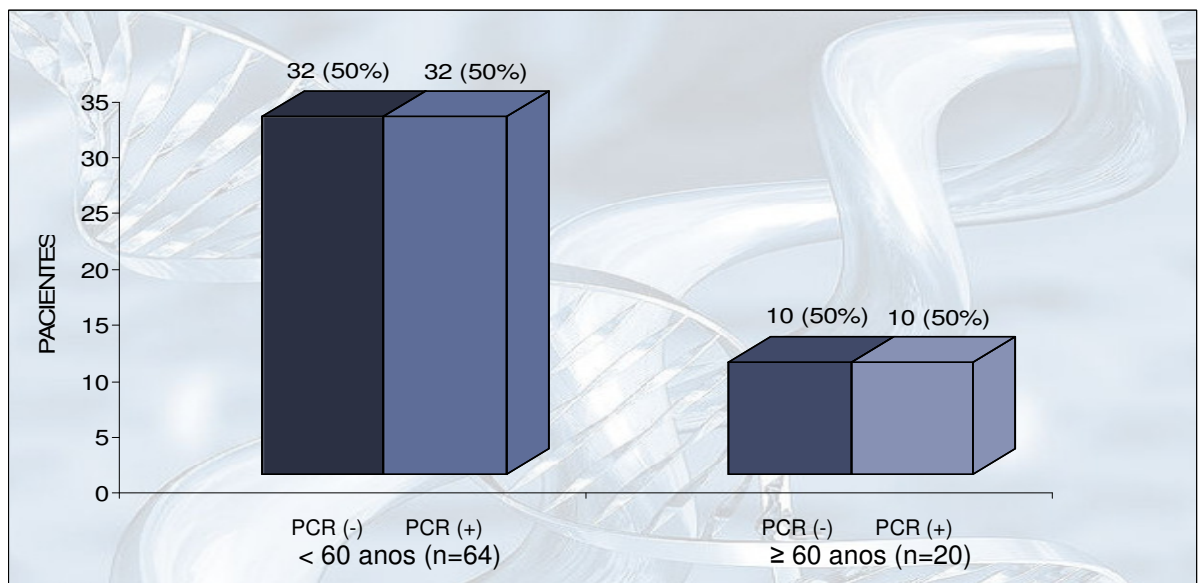


GRÁFICO 6 - RELAÇÃO ENTRE A IDADE VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

NOTA: Relação entre a positividade da amostra na técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR e a idade acima e abaixo de 60 anos ($p=1,00$).

4.11 RELAÇÃO ENTRE TEMPO OPERATÓRIO E POSITIVIDADE NOS TESTES ESTUDADOS

A análise da relação entre a presença de bacteribilia e o tempo operatório inferior ou superior a 60 minutos não demonstrou diferença estatisticamente significativa através da cultura automatizada ($p=0,4$) ou pela técnica de PCR ($p=0,6$), conforme demonstrado nas TABELAS 7 e 8.

TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE O TEMPO OPERATÓRIO VS CULTURA AUTOMATIZADA

| TEMPO OPERATÓRIO (MINUTOS) | CULTURA | | TOTAL |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------|
| | NEGATIVA | POSITIVA | |
| ≥ 60 MINUTOS | 35 (85,37%) | 6 (14,63%) | 41 |
| < 60 MINUTOS | 33 (76,74%) | 10 (23,26%) | 43 |

NOTA: Relação entre a cultura automatizada e o tempo operatório acima e abaixo de 60 minutos ($p=0,408$).

TABELA 8 - RELAÇÃO ENTRE O TEMPO OPERATÓRIO VS REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

| TEMPO OPERATÓRIO (MINUTOS) | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR | | TOTAL |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|-------|
| | NEGATIVO | POSITIVO | |
| ≥ 60 MINUTOS | 22 (53,66%) | 19 (46,34%) | 41 |
| < 60 MINUTOS | 20 (46,51%) | 23 (53,49%) | 43 |

NOTA: Relação entre a reação em cadeia da polimerase - PCR e o tempo operatório acima e abaixo de 60 minutos ($p=0,663$).

5 DISCUSSÃO

Conforme apresentado na Revisão da Literatura, a questão referente à presença de bactérias na bile permanece bastante controversa, com grande número de resultados díspares entre estudos freqüentemente utilizando metodologias distintas. Ao utilizar as ferramentas proporcionadas pela biologia molecular introduziu-se uma nova abordagem, partindo do pressuposto de uma maior acuidade a partir da detecção de DNA bacteriano.

A seguir, os resultados obtidos são discutidos de maneira organizada mediante os diferentes aspectos analisados:

5.1 IDADE

A literatura é bastante ampla quando considera a possível relação entre a idade e a presença de bacteribilia, independente do método escolhido para a confirmação de presença de flora bacteriana na bile (RICO et al., 1989; CSENDES et al., 1996; GALILI et al., 2008), podendo-se mesmo questionar se este aspecto estará relacionado a um maior índice de complicações nas cirurgias das vias biliares em pacientes mais idosos. MULVIHILL, em 1998, descreveu taxa de mortalidade em pacientes acima de 80 anos de 5,56% em comparação com indivíduos abaixo dos 50 anos (0,02%) pós colecistectomias eletivas. Complicações locais e/ou sistêmicas, além de maior taxa de conversão para a cirurgia convencional, também são relatados na literatura (TOCCHI et al., 2000; WALLING, 2004).

AMARAL et al., em 2006 estudaram 1864 pacientes, sendo destes 294 acima de 65 anos e obtiveram positividade na cultura de bile para esta faixa etária de 11%; AL HARB, et al., em 2001, descreveram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de culturas positivas, em frascos de BacT/ALERT®, em pacientes idosos (11%); OHDAN et al., 1993, descreveram também positividade de 14,7% em pacientes acima de 60 anos. LEWIS et al., 1987, LEEUWEN et al., 1985 e KEIGHLEY et al., 1975, descreveram taxas de 67%, 36% e 54% de culturas positivas em pacientes acima de 70 anos, respectivamente, todos com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$). WILLIS et al., 1984, TRUEDSON et al., 1983, COX et al., 1978 e NIELSON e JUSTESEN, 1976 descreveram culturas positivas em pacientes acima de 60 anos, em 18% ($p < 0,005$), 26% ($p < 0,02$), 44%

($p < 0,005$) e 16% ($p < 0,01$) dos casos, respectivamente. CHA et al., 1993, na Coreia, descrevem 247 culturas de bile (45,2%) em 546 pacientes com doença biliar, com uma positividade de 66% em pacientes acima de 60 anos ($p < 0,005$).

PYRTEK, et al., 1967, relataram em seus estudos que a incidência de culturas positivas na bile pode variar de 0 a 15% em pacientes abaixo de 59 anos, todavia praticamente dobra após cada década de vida: 31% para a década de 60, 60% na década de 70 e 100% para pacientes acima de 80 anos. No presente estudo obteve-se uma positividade para a bacteribilia analisada pelo método de cultura convencional BacT/ALERT® de 40% ($p = 0,018$) e 50% ($p = 1$) através da técnica de reação em cadeia da polimerase, sendo este último resultado estatisticamente significativo.

No presente estudo, a análise da positividade nos testes mediante a cultura automatizada com frascos de BacT/ALERT® SA demonstrou valores com maior índices de positividade para os pacientes acima de 60 anos, mais predispostos a apresentarem maior frequência de bactérias quando acometidos por processos infecciosos, sendo até considerados grupo de alto risco, conforme demonstrado na literatura (TRUEDESON et al., 1983; LEWIS et al., 1987; CSENDES et al., 1996; AL HARBI et al., 2001 e AMARAL et al., 2006). Diferentemente, na análise mediante o método de reação em cadeia da polimerase – PCR, os resultados observados foram iguais para idades acima e abaixo de 60 anos (50%). Este achado provavelmente deve-se à maior sensibilidade deste método, podendo detectar a presença de DNA bacteriano mesmo em níveis bastante reduzidos.

5.2 TEMPO CIRÚRGICO

Todos os 84 casos operados de colecistectomia foram por videolaparoscopia, com tempo médio de $60,99 \pm 21,41$ minutos, tempo este em concordância com os relatos de alguns autores na literatura mundial. Vários trabalhos descrevem a realização da colecistectomia com tempo médio abaixo de 90 minutos, tais como: PATEL et al, 1996 em 20 pacientes, 80 minutos; HENRIQUES et al., 2000, 85 minutos em 50 pacientes; AL HARBI et al., 2001 em 112 cirurgias, 60 minutos; SANTOS et al., 2001 em 314 casos, 79 minutos; HENRIQUES et al., 2002, 85 minutos em 60 pacientes e alguns acima desta média, como: KIVILUOTO et al., 1998, em 63 casos, 108,2 minutos, sendo destes 10 a 15 para a colangiografia

transoperatória; LORD et al., 1998, 118 minutos para 100 pacientes e ROS et al., 2001 em 362 colecistectomias (100 minutos), todos por colecistopatia crônica calculosa sintomática. HANGUI em 2004 relata a realização de 693 colecistectomias videolaparoscópicas por doença litíase, com tempo cirúrgico médio de 114 minutos.

A análise dos tempos operatórios com os resultados dos métodos empregados não demonstrou significância estatística. Caberia resaltar que das 84 amostras coletadas 79 (94%) foram feitas mediante punção direta da vesícula logo no início do procedimento cirúrgico. As demais coletas, 4 (4,7%) foram realizadas com a vesícula na parede abdominal (portal do trocater umbelical) e apenas uma (1,2%) na mesa de instrumentação cirúrgica. Destes 5 casos, onde o tempo operatória poderia influenciar numa possível translocação bacteriana, haja vista que as coletas foram realizadas no final da cirurgia, tanto as culturas automatizadas quanto as reações em cadeia da polimerase foram negativas. Dentre toda a literatura estudada, somente TOCCHI et al., em 2000, analisaram o tempo operatório e resultado de culturas de 84 colecistectomias videolaparoscópicas. Observaram que dos 41% dos casos (35 pacientes) que apresentaram culturas de bile positivas, as cirurgias foram realizadas com média de 90 minutos de duração.

5.3 COMPLICAÇÕES EM FERIDAS OPERATÓRIAS

Durante várias décadas, vários autores têm descrito a bacteribilia como sendo a principal causa de infecção da ferida operatória. Os dados obtidos são bastante diversos e variam muito de acordo com as comorbidades associadas e fatores de risco, tais como: a idade acima de 60 anos, coledocolitíase, cirurgias prévias na via biliar, icterícia, obesidade mórbida e diabetes melitus, além do grau de comprometimento inflamatório da vesícula biliar (KEIGHLEY et al., 1976; BRENNER et al., 1986; WESTPHAL e BROGARD, 1999; AMARAL et al., 2006). A presença de cálculos biliares marrons também é descrita como fator de risco por TABATA e NAKAYAMA, em 1981 e AHMED et al., 2000.

SUZUKI et al., em 1984 e CHETLIN et al., em 1973, afirmam que as complicações pós-operatória, dentre elas a da ferida operatória, são 40 vezes mais freqüentes em pacientes com cultura positiva na bile.

A literatura descreve uma incidência de infecção de ferida operatória pós colecistectomia por colecistite crônica calculosa entre 2 a 20% nas cirurgias convencionais (STONE et al., 1977; BRENNER et al., 1987), podendo chegar a 41% nas cirurgia de emergência (KEIGHLEY et al., 1977) e de 0,7 a 10% nas videolaparoscópicas, principalmente no portal umbelical (TOCCHI et al., 2000 e HUSSAIN e KHAN, 2006). MACLEAN et al., 1975, estudaram 1000 colecistectomias e relataram que inflamações agudas da vesícula biliar aumentam os índices de infecção da ferida operatória de 1,4 a 8,5% ($p<0,001$), com maior incidência em pacientes acima de 60 anos em comparação com os abaixo desta mesma idade ($p<0,002$).

CHANG et al., em 2006, descrevem a presença de 0,7% de infecção de ferida operatória com antibioticoterapia profilática e 1,5% sem o uso de antibiótico para pacientes com colecistite crônica calculosa operados por videolaparoscopia.

No presente estudo não foi observado nenhum caso de infecção de ferida operatória, sendo que todos os pacientes foram acompanhados no 1º, 10º e 30º dias de pós-operatório e receberam antibioticoterapia profilática na indução anestésica.

5.4 RESULTADOS DA CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE

Em todas as amostras avaliadas foram coletado 10ml de bile para a cultura.

O meio de cultivo utilizado para a realização das culturas de bile, foi o Aerobic Blood Culture Media ou BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) sem inibidor de antibióticos, devido ao seu fácil manuseio, boa acessibilidade e sensibilidade, monitorização não invasiva e contínua do crescimento microbiano, contribuindo para diminuir a chance de resultados falso-positivos, além de menor tempo para positivizar ou negativar a amostra (BOURBEAU et al., 1998; SILVA, 2000; LAKSHMI, 2001; FERREIRA, 2008).

De todos os 84 casos estudados, em 16 amostras obteve-se culturas positivas, perfazendo um percentual de 19%.

Conforme observado na TABELA 9, esta incidência situa-se na faixa inferior da incidência observada entre os diversos autores, onde observa-se ampla variação de 0 a 73%.

TABELA 9 - POSITIVIDADE DE CULTURAS DE BILE EM COLECISTOPATIA CRÔNICA

| Autor | Positividade |
|------------------------|--------------|
| Edlund, et al., 1948 | 0% |
| Csendes et al., 1979 | 0% |
| Ann Lou et al., 1977 | 10% |
| Lewis et al., 1977 | 11% |
| Pyrtek et al., 1967 | 12% |
| Truedson et al., 1983 | 16% |
| Grande et al., 1991 | 16% |
| Brenner et al., 1987 | 19% |
| Delikaris et al., 1977 | 40% |
| Tocchi et al., 2000 | 41% |
| Isemberg et al., 1978 | 42% |
| Fukunaga et al., 1973 | 42% |
| Flemma et al., 1967 | 47% |
| Al Harbi et al., 2001 | 50% |
| Anderson et al., 1951 | 52% |
| Goldman et al., 1948 | 57% |
| Stone et al., 1977 | 60% |
| Lu et al., 2003 | 73% |
| Presente estudo | 19% |

Esta ampla variabilidade em relação à positividade de culturas em bile de pacientes portadores de colecistopatia crônica demonstra o real desconhecimento das condições de contaminação da bile, tendo sido este um dos principais elementos para a formulação deste trabalho utilizando método alternativo de abordagem desta ocorrência.

No que diz respeito à bile de vesículas biliares normais, isto é, sem doença aparente, existe consenso de que esta é praticamente estéril, com a maioria das culturas sendo negativas, conforme descrito por ANDREWS e HENRY, 1935 (87,5%); EDLUND et al, 1959 (90%); MASON, 1968 (100%); CSENDES et al, 1975 (100%); NIELSEN e JUSTESEN, 1976 (100%); VERNA et al., 2002 (100%).

Os principais microorganismos identificados nas amostras positivas foram a *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphilococcus aureus*, seguidos pela *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Enterobacter*, dados estes em conformidade com os descritos na literatura (PIERSOL e BOCKUS, 1923; ANDERSON e PRIESTLEY, 1951; GLENN,

1958; EDLUND et al, 1959; MASON, 1968; VASCONCELOS, 1970; FUKUNAGA, 1973; RAIA e OKUMURA, 1974; WILLIS et al., 1984; GRANDE et al., 1991; BOTTONE e ZHANG, 1995; HOED et al., 1998; AL HARBI et al., 2001; FLORES et al., 2003; AMARAL et al., 2006)

No presente estudo não foi contemplada a análise através de cultura da bile para a presença de bactérias anaeróbicas. Além das dificuldades técnicas de realizar tais exames em condições de completa anaerobiose, a presença destas bactérias não é esperada na bile devido à presença de ácidos biliares os quais são conhecidamente inibidores de crescimento de várias bactérias intestinais “*in vitro*”. Bactérias intestinais anaeróbicas gram-negativas e positivas, como os lactobacilos e os clostrídios, são altamente sensíveis à presença de ácidos biliares desconjugados como os ácidos cólicos, desoxicólicos e litocólicos. (LIN et al, 1995).

GORDON –TAYLOR e WHITBY em 1930 relataram em seu trabalho que bactérias anaeróbicas, em especial o *Clostridium welchii*, seria um hospedeiro dominante da porção central de cálculos, devido à sua forma esporolada. Esta poderia ser ativada mediante a ocorrência de colecistite gangrenosa, como resultado da anóxia da parede da vesícula biliar. Esta anóxia resultada da necrose tecidual seria favorável ao crescimento desta bactéria, demonstrando a sua maior frequência na parede vesicular ao invés da bile propriamente dita. THORSNESS, 1934, descreve a raridade desta bactéria e postula que seria proveniente do trato intestinal e que alcançaria a via biliar através do sistema portal ou por ascensão pelo duodeno, via coledociana, principalmente em casos de colecistite aguda e coledocolitíase, corroborado por SCHOTTENFELD, 1950. Em 1954, EDLUND et al., demonstraram a frequência de 22% e 25% de bactérias anaeróbicas em colecistite aguda e coledocolitíase, respectivamente.

Em estudo experimental NIELSEN e JUSTESEN, em 1975, demonstraram que a rota de infecção anaeróbia era hematogênica, e que quando por essa via, a bactéria anaeróbia, não sobreviveria ao seu transporte e penetração na via biliar. Demonstraram também a maior prevalência nos casos de obstrução biliar e colecistite aguda. SHIMADA et al., 1977, atribuiu a infecção por bactérias anaeróbia à presença de obstrução da via biliar e pelo sítio de infecção ser fechado ou semi-fechado.

BOURGAULT et al, em 1979 na Clínica Mayo, analisou 1892 pacientes operados por doença biliares, onde 371 culturas de bile foram realizadas, focando

principalmente no estudo de bactérias anaeróbias. A maior incidência ocorreu em pacientes com história de múltiplas e complexas manipulações cirúrgicas do trato biliar, particularmente as anastomoses bilio-digestivas e manipulações do ducto hepático comum; obstrução da via biliar e quadros mais graves de colecistite aguda. Em concordância com os dados descritos acima: ANN LOU et al. e ENGLAND et al., em 1977 descrevem resultados semelhantes com quadros de colecistite aguda enfisematosa e obstrução da via biliar. PITT et al., em dois estudos (1982 e 1983) e CLAEISSON et al. (1983), advogaram que a presença de anaeróbios é mais freqüente em pacientes idosos com quadros agudos, principalmente em vigência de colangite e cirurgias de emergência, respectivamente. A partir destes relatos, e conforme demonstrado na TABELA 11, observa-se a pouca relevância da infecção por anaeróbios nas doenças do trato biliar.

TABELA 10 - HISTÓRICO DE ESTUDOS SOBRE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS NA BILE HUMANA

| AUTOR (ANO) | N CASOS POSITIVOS NA BILE | % BACTÉRIAS ANAERÓBIAS |
|------------------|------------------------------|------------------------|
| DRENNEN (1922) | 100 | 12% |
| JUDD (1927) | 193 | 6,7% |
| WILKIE (1928) | 50 | 8% |
| RAHA (1965) | 23 | 0% |
| FLEMMING (1967) | 32 | 0% |
| SCOTT (1967) | 44 | 0% |
| JOUANNEAU (1968) | 56 | 0% |
| SCOTT (1968) | 23 | 0% |
| WATSON (1969) | 17 | 0% |
| GOSWITZ (1970) | 8 | 0% |
| ROBSON (1970) | 23 | 0% |
| CHETLIN (1971) | 80 | 1% |
| CHAITIN (1973) | 75 | 0% |
| GOSWITZ (1974) | 118 | 0% |
| KEIGHLEY (1974) | 150 | 0% |
| CSENDES (1975) | 100 | 1% |
| WOLLOCH (1977) | 167 | 0% |
| BERGAN (1979) | 50 | 0% |
| BRISMAR (1986) | 84 | 3,5% |
| BRENNER (1987) | 47 | 6% |
| BROOK (1989) | 145 | 3% |
| GRANDE (1991) | 198 | 3% |
| AL HARBI (2001) | 112 | 0% |
| FLORES (2003) | 23 | 4% |
| CHANG (2006) | 277 | 0,7% |

FONTE: Adaptado por GORDON-TAYLOR e WHITBY, 1930; NIELSEN e JUSTESEN, 1976

5.5 PESQUISA DE DNA BACTERIANO POR PCR

Analisando do ponto de vista microbiológico distinto, ou seja, pela detecção de DNA bacteriano ao invés da identificação de colônias de agentes patógenos pelos métodos de cultura convencionais, pode-se supor que a incidência de bactérias na bile destes pacientes seja possivelmente superior àquela usualmente estimada. Isto se deve à aparente maior sensibilidade da técnica de PCR para a detecção da presença de bactérias (LIN et al., 1995; HO et al., 2000; SILVA, 2003; CARRAPA et al., 2005).

Neste estudo, foi detectada a presença de DNA bacteriano em 50% das amostras coletadas, num total de 42 pacientes.

SWIDSINSKI et al., em 1998 realizaram estudo comparativo entre a cultura simples de cálculos biliares *versus* o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), provenientes de 100 pacientes com colelitíase crônica, colecistectomizados por vídeolaparoscopia. O método da PCR foi positiva em 82% dos casos, sendo em 11 casos (11%) observada uma elevada concentração de bactérias e em 71% uma baixa concentração de bactérias. A cultura foi positiva em apenas 9 amostras. Dois anos depois, HIRAMATSU et al., realizaram um estudo com o intuito de detectar e identificar bactérias no fígado de pacientes com doenças da via biliar, através do método de reação em cadeia da polimerase utilizando um *primer* universal, obtendo 5% de positividade para pacientes com colecistite crônica calculosa e 75% em pacientes com cirrose biliar primária ($p < 0,0001$). Diferentemente destes estudos, o presente estudo foi realizada exclusivamente na bile de vesículas biliares retiradas devido à presença de colecistite.

Primeiramente com a descoberta, da bactéria *Campylobacter pyloridis*, em 1983 por WARREN e MARSHALL, em duas publicações distintas no The Lancet, a mudança da nomenclatura para *Helicobacter pylori* por GOODWIN et al., em 1989 e correlação com varias doenças do trato gastrointestinal (MARSHALL et al., 1987; GONÇALVES, 1996; SILVA, 2003), vários trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de demonstrar de forma mais clara esta relação, e por conseqüência, acelerar o seu diagnóstico. Vários autores relacionaram esta bactéria e outras do gênero *Helicobacter*, para a pesquisa do DNA bacteriano na bile, devido à dificuldade de seu isolamento através de cultura convencional, conseqüente à sua conversão de

forma espiralada (viável) em forma cocóide (não viável) em ambiente rico em bile (SILVA, 2003).

O DNA do *Helicobacter pylori* foi encontrado na bile humana em estudo realizado por LIN et al, em 1995, utilizando a técnica de PCR e *primers urease A*. Naquele estudo, três de sete amostras de bile foram positivas

Em estudo retrospectivo em humanos, FOX et al., em 1998, demonstraram a presença de bactérias do gênero *Helicobacter* na bile e fragmentos de vesícula biliar de mulheres com colecistopatia crônica calculosa. Este estudo foi desenvolvido utilizando a técnica de PCR com *primers* específicos para este gênero de bactéria além de cultura convencional. A positividade para a técnica de PCR foi de 39% e cultura 0%.

Outros estudos, como o de MYUNG et al., em 2000, demonstraram positividade de 9% (43 amostras) para a presença de DNA bacteriano do *Helicobacter pylori* utilizando dois *primers* específicos (26 k Da e *urease A*). BULAJIC et al., em 2001 estudaram a especificidade e confiança da técnica de PCR para a presença de *Helicobacter pylori* na bile de 87 pacientes com doenças biliares, obtendo 55% do total com resultados positivos. Em 2005, NERI et al., estudaram a presença de *Helicobacter pylori* em 32 pacientes colecistectomizados por videolaparoscopia com colecistite crônica calculosa, por PCR, onde obtiveram resultado positivo em 76% das amostras estudadas, e finalmente, FARSHAD et al., no Irã em 2006, observaram 11% de casos positivos na PCR de pacientes com colecistopatia calculosa crônica para pesquisa de *H. pylori* e 0% em pacientes na qual a bile foi retirada de cadáveres sem doença biliar.

Estes altos índices de resultados positivos para a presença de DNA bacteriano de bactérias do gênero *Helicobacter* na bile, não significa a colonização dos mesmos, ou seja, não significa a presença das bactérias em si, podendo dever-se somente à presença de material genético na própria via biliar através da circulação entero-hepática, ou ainda por colonização ascendente através da papila de Vater em pacientes submetidos à procedimentos que levem à ablação do esfíncter (SILVA, 2003). Com relação ao presente estudo, foram utilizados somente *primers* universais, diferentemente dos trabalhos científicos com as bactérias do gênero *Helicobacter*, onde os *primers* utilizados foram específicos para estas bactérias, isto não significa que boa parte dos casos positivos, no presente estudo, não sejam de bactérias do gênero *Helicobacter*.

5.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE A TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR *VERSUS* CULTURA AUTOMATIZADA DE BILE

A grande maioria dos trabalhos científicos publicados até o momento utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase no estudo da via biliar, tiveram como principal foco o *Helicobacter pylori*. Sabendo-se que esta bactéria espiralada não cresce em meios de cultura convencional devido a sua conversão de forma espiral (viável) em forma cocóide (não viável) em meios ricos em bile, a cultura dificilmente é utilizada como meio de comparação em estudos com a PCR (SILVA, 2003). Todavia alguns autores utilizaram biópsias hepáticas e análise em cálculos biliares em seus estudos, comparando os dois métodos (SWIDSINSKI et al., em 1998 e HIRAMATSU et al., 2000), respectivamente.

No presente estudo os dados obtidos mediante a PCR revelam uma maior positividade para a detecção de DNA bacteriano (50%) do que a incidência observada pela cultura automatizada para o crescimento de colônias (19%). Tais resultados, embora sugestivos de maior sensibilidade para a técnica de PCR, não devem ser observados como uma comparação direta entre estes dois métodos, uma vez que a cultura automatizada visa identificar a existência de bactérias viáveis enquanto a PCR é específica para a presença de seqüências de DNA bacteriano independentes de sua viabilidade.

No que diz respeito às especificidades na execução de cada um destes dois métodos, a técnica de PCR não necessita cuidados específicos além da assepsia no tratamento, transporte e estoque da amostra a ser estudada. Além disso, as amostras embebidas em meios de transporte ou tratados com fixadores não afetam os resultados da PCR. O tempo não é fator limitante, pois o DNA pode resistir às mudanças ambientais por longo tempo. Além disto, apresenta elevada sensibilidade e especificidade podendo oferecer resultados rápidos, seguros e menos dispendiosos quando comparados a outras técnicas moleculares (LIN, 1995; HO, 2000; MESQUITA, 2001; SILVA, 2003; CARRAPA, 2005; LUPPINO e SANT'ANNA, 2005). Embora o método da PCR não seja considerado de alto custo, existe certa dificuldade na sua implementação nas rotinas laboratoriais devido à necessidade de equipe altamente especializada e aparelhagem específica (MONTEIRO, et al., 1997; ANTONINI et al., 2004).

Por outro lado, a utilização das culturas simples e da automatizada é mais freqüentes nos laboratórios de análises clínicas. São métodos diagnósticos baratos e de fácil utilização. Segundo LAKSHMI, 2001, em estudo de 1500 culturas, o método de cultura automatizada BacT/ALERT® foi mais rápido e mais sensível que o convencional, além de isolar mais bactérias que àquele. KARAHAN et al., em 2006, na Turquia e THORPE et al., 1990, em Durhan nos EUA, ainda enfatizam que embora os métodos tradicionais sejam de mais fácil manuseio e não necessitem de instrumental especializado, possuem certas limitações. Como vantagens à completa automatização do método, observaram a necessidade de menor tempo para identificação de patógenos, otimizando e facilitando assim o fluxo de trabalho dentro do laboratório.

A pesquisa de segmentos de DNA que utiliza iniciadores universais, pode identificar qualquer tipo de DNA, não indicando especificamente bactérias viáveis ou apenas fragmentos bacterianos presentes na amostra. Baseados nisso, aventou-se à hipótese da existência de resíduos bacterianos secundários ao processo de esterilização com radiação gama, que estariam aderidas em seringas, agulhas e frascos de coleta e portanto não identificados nas culturas, dando origem a resultados falso-positivos. Esta hipótese já foi sugerida por TRAMPUZ et al., em 2006, quando investigaram em frascos estéreis pelo processo de radiação gama a viabilidade do DNA de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*, com o uso da PCR e 16S rRNA (TRAMPUZ et al., 2006). MEIRE, et al., 1993, CURSONS et al., em 1999 e HO, WINDSOR, em 2000 e FENOLLA et al., 2006, relatam também que, devido à alta sensibilidade do método de PCR, contaminações podem ocorrer durante a coleta do material ou ainda durante a realização de toda a técnica, como uso de reagentes com contaminação externa.

Em 7 casos (8,3% da amostra), do presente estudo, a cultura foi positiva enquanto a PCR foi negativa. Conforme protocolo do Laboratório de Biologia Molecular da Univille, todo resultado negativo foi refeito e reconfirmado. Esta metodologia também foi utilizada por QIAN et al., 2001; DROSTEN et al., 2002 e KARAHAN et al., em 2006.

BOURBEAU et al, em 1998 relataram que a cultura automatizada necessita de meios completamente estéreis para se evitar a contaminação externa, evitando-se, assim, os resultados falso-positivos.

Na literatura são descritos casos de contaminação exógena de amostras quando da realização da cultura de bile e dentre os patógenos mais comuns, observaram o *Staphylococcus* (NICKEL e JUDD, 1930; LYON, 1932; ANDREWS e HENRY, 1935; CALLAN, 1939; ERKELES e MIRIZZI, 1942; MASON, 1968; DYE et al., 1978 e NOMURA et al., 1999). No presente estudo, dos sete casos positivos, em três houve crescimento de *Staphylococcus*, perfazendo 43% das amostras. A análise bacterioscópica, ainda revelou maior prevalência de *E. coli* e *Klebsiella*, condizente com os dados da literatura mundial (TWISS et al., 1951; EDLUND et al., 1959; CHAITIN e WHITESTONE, 1973; GALLAGHER et al., 1982; AL HARBI et al., 2001; MANOLIS et al., 2008).

Em 2001, LAKSHMI, na Índia, realizou estudo comparativo entre culturas automatizadas de bile com BacT/ALERT® e método convencional (placas sólidas) e observou que dos 158 casos analisados, 8 amostras (5%) apresentaram resultados BacT/ALERT® falso positivos em comparação com a cultura convencional. No mesmo ano, QIAN et al., na Clínica Mayo, relataram 1,3% de resultados falso-positivos em culturas automatizadas realizadas com BacT/ALERT® e discutiram que elevados índices de leucócitos circulantes podem promover resultado falso positivo no sistema BacT/ALERT®, com dados estatisticamente significativos ($p=0.001$), sugerido também por NOLTE et al., 1993. KEIGHLEY et al., 1977, descreveram em seu estudo que os índices de falso positividade para as culturas de bile pode variar de 6 a 17%, dependente do método utilizado, dos cuidados da equipe de bioquímicos e da presença de leucócitos polimorfonucleares circulantes em grande quantidade, muito presentes nas fases agudas da infecção. Portanto estes dados são condizentes com os resultados do presente estudo.

Em contrapartida, como possível causa para os possíveis resultados falso negativos no método da PCR, são descritos a presença de quantidades de DNA abaixo da sensibilidade de detecção do teste, como demonstrado por Pardini em seus comentários sobre a pesquisa de *Chlamydia pneumoniae*, *Citomegalovírus*, *Helicobacter pylori*, herpes simples, dengue e hepatite B pelo método de PCR, dados corroborados por HO e WINDSOR, em 2000. Os mesmos autores descreveram, ainda, que resultados falso negativos podem ocorrer quando a sequência alvo do DNA sofre danos químicos, como por exemplo pelo tecido de fixação, momentos antes de ser amplificado. MONTEIRO et al., em 1997 e LIMA et al., 2006, relatam que falhas humanas na extração do DNA bacteriano, sua

destruição ou problemas na detecção dos *amplicons* pela eletroforese com gel de agarose, podem ocorrer devido à subjetiva avaliação, especialmente quando reações com bandas negativas estão presentes, além de problemas nos programas de leitura pela eletroforese.

5.7 RESULTADO DA ANATOMIA PATOLÓGICA E SUA RELAÇÃO AOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DA BACTERIBILIA E SUA POSITIVIDADE

É sabidamente conhecido que os índices de infecção da via biliar são muito maiores nos quadros agudos ou reagudizados do que nas colecistopatias crônicas. Estes índices podem chegar a 100% nas colecistites agudas complicadas com colangite (LEWIS et al., 1987; CSENDES et al., 1996; FLORES et al., 2003), quando associadas a processos obstrutivos congênitos ou adquiridos e os de causa intrínseca como bile espessa, exsudato inflamatório, rolhas de muco e áscaris (RAIA e OKUMURA, 1974; LÖTVEIT et al., 1978; PITT, et al. 1982; BRENNER et al., 1997 WESTPHAL e BROGARD, 1999).

O presente estudo demonstrou uma incidência de 82,25% de laudos anatomo-patológicos de colecistite crônica calculosa e 17% de quadros com reagudização não diagnosticados à macroscopia.

A análise individual de cada grupo de pacientes, com doença crônica e crônica agudizada, demonstrou resultados diferentes quando comparados aos métodos de detecção bacteriana. A positividade das amostras no método de cultura automatizada para a colecistite crônica calculosa foi de 14,49% enquanto na colecistite crônica agudizada foi de 40%, demonstrando maior correlação com o volume de bactérias presentes. GOSWITZ, em 1974, descreveu positividade nas culturas de bile de 60% nos casos de colecistite crônica calculosa reagudizada e apenas 5% nos quadros sem agudização. JÄRVINEN et al, 1978, descreveram estudo em 460 pacientes, onde em 151 casos os pacientes eram portadores de colecistite calculosa reagudizada e destes 43 (29%) apresentaram cultura positiva. Dois anos depois o mesmo autor (JÄRVINEN, 1980), relatou estudo comparativo entre as várias fases da colecistite aguda, dentre elas a reagudizada, onde observou 31% de culturas positivas. Concluiu que a maior incidência de bacteribilia foi nas fases iniciais do processo agudo e que esta diminuiu com o passar dos dias e que voltava a aumentar na reagudização ($p < 0,001$).

A maior sensibilidade do método de PCR pode ser demonstrada através da detecção de bactérias mesmo em quantidades menores, não havendo conseqüentemente diferença significativa entre os pacientes agudizados ou não (60% e 47,8%, respectivamente). Demonstra, desta forma, que quanto mais sensível o método, menor quantidade de bactéria será necessária para positivar o teste. Levando em conta, mais uma vez, que os dois métodos utilizados no presente estudo não são comparáveis e sim combináveis, estes resultados refletem a real incidência de bactérias na bile das diferentes situações inflamatórias da vesícula biliar.

6 CONCLUSÕES

- A) A incidência de bacteribilia observada pela reação em cadeia da polimerase - PCR é superior àquela evidenciada mediante a cultura automatizada.
- B) Os resultados sugerem que embora a cultura tenha sido até o momento utilizada como método padrão para a pesquisa da incidência de bacteribilia, seus resultados podem ser comprometidos pela limitação da técnica. Neste caso, a real incidência de bacteribilia em pacientes portadores de colecistopatia crônica pode ser bastante superior àquela sugerida na literatura atual.
- C) A incidência de bacteribilia em pacientes acima de 60 anos mediante cultura automatizada é significativamente superior do que aquela encontrada em pacientes abaixo desta idade. Estes resultados podem sugerir menor sensibilidade deste método quando comparados àqueles obtidos pela técnica de PCR nas duas faixas etária.
- D) A incidência de bacteribilia em pacientes portadores de colecistite crônica calculosa é significativamente superior mediante cultura automatizada nos casos agudizados quando comparada aos casos não agudizados. Estes resultados podem sugerir menor sensibilidade deste método quando comparados àqueles obtidos pela técnica de PCR nos casos agudos e não agudos.
- E) A incidência de bacteribilia mediante cultura automatizada e pela técnica de PCR em pacientes portadores de colecistopatia calculosa quando analisados os tempos operatórios acima e abaixo de 60 minutos, não demonstra diferença significativa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; CHEUNG, R. C.; KEEFFE, E. B. Management of gallstones and their complications. **Am. F. Phys.**, v. 61, n. 6, p. 1673-1680, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. DNA. In: _____. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 1999. cap. 6. p. 185-212.
- _____. Tecnologia de DNA. In: _____. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 1999. cap. 10. p. 319-353.
- AL HARBI, M.; OSOBA, A. O.; MOWALLAD, A.; AL-AHMADI, K. Tract microflora in Saudi patients with cholelithiasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, n. 7, p. 570-574, jul. 2001.
- ALMEIDA, M. E.; SERAFIM, R. C.; EÇA, L. P. M. Apresentação de algumas técnicas utilizadas na biologia molecular. In: EÇA, L. P. (Coord.). Biologia Molecular: guia prático e didático. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. 11. p. 145-176.
- AMARAL, P. C. G.; ÁZARO FILHO, E. M.; FORTES, M. F.; ETTINGER JR, E.; CANGUSSU, H. C.; FAHEL, E. Taxas de complicações e tempo de permanência hospitalar foram maiores em pacientes idosos submetidos a videolaparocolecistectomia: resultados após colecistectomia videolaparoscópica em pacientes idosos. **Rev. Bras. Videocir.**, v. 4, n. 2, p. 48-53, 2006.
- AMARAL, P. C. G.; ÁZARO FILHO, E. M.; SALEM, E. M.; GALVÃO, T. D.; MAGALHÃES, G.; FAHEL, E. Vídeolaparocolecistectomia (VLC) na colecistite aguda e colecistite crônica: Estudo comparativo. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 19, n. 3, p. 106-109, 2006.
- ANDERSON, R. E.; PRIESTLEY, J. T. Observations on the bacteriology of choledochal bile. **Ann. Surg.**, v. 133, n. 4, p. 486-489, abr. 1951.
- ANDREWS, E.; HENRY, L. D. Bacteriology of normal and diseased gallbladders. **Arch. Intern. Med.**, v. 56, p. 1171-1188, 1935.
- ANN LOU, M. ; MANDAL, A. K.; ALEXANDER, J. L.; THADEPALLI, H. Bacteriology of the human biliary tract and the duodenum. **Arch. Surg.**, v. 112, p. 965-967, ago. 1977.
- ANTONINI, S. R. C.; MENECHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. Técnicas básicas de biologia molecular. **Universidade Federal de São Carlos (ufSC/ar) - Centro de Ciências Agrárias**, Araras, p. 1-56, jul. 2004.
- BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fonts escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 26, n. 4, p. 1-11, out/dez, 2004

BERGAN, T.; DOBLOUG, I.; LIAVÅG, I. Bacterial isolates in cholecystitis and cholelithiasis. **Scand. J. Gastroent.**, v. 14, p. 625-631, 1979.

BOSSHARD, P. P.; KRONENBERG, A.; ZBINDEN, R.; RUEF, C.; BÖTTGER, e. c.; ALTWEGG, M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: A 3-Year Experience. **CID**, v. 37, p. 167-172, 15 jul. 2003.

BOTTONE, E. J.; ZHANG, D. Y. *Haemophilus parainfluenzae* biliary tract infection: Rationale for an ascending rout of infection from the gastrointestinal tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 3042-3043, nov., 1995.

BOURBEAU, P.; RILEY, J.; HEITER, B. J.; MASTER, R.; YOUNG, C.; PIERSON, C. Use of the BacT/Alert Blood Culture System for culture of sterile body fluids other than blood. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 11, p. 3273-3277, nov. 1998.

BOURGAULT, A. M.; ENGLAND, D. M.; ROSENBLATT, J. E.; FORGACS, P.; BIEGER, R. C. Clinical characteristics of anaerobic bactibilia. **Arch. Intern. Med.**, v. 139, n. 12, p. 1346-1349, dez. 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 930, de 27 de agosto de 1992. Expede, na forma de anexos, normas para o controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 ago. 1992. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=490> . Acessado em: 28/8/2008.

BRAVOS, E. D.; GILMAN, R. H. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 29, n. 4, p. 925-929, dez. 2000.

BRENNER, S.; WIEDERKEHR, J. C.; MARCHESINI, J. B.; MALAFAIA, O.; COELHO, J. C. U.; SOUZA, F. J.; SOUZA, H. M. Bacterioscopia transoperatória em cirurgia de vias biliares. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 14, n. 2, p. 83-86, mar./abr. 1987.

BRENNER, S.; WIEDERKEHR, J. C.; MARCHESINI, J. B.; SOUZA, F. J.; MALAFAIA, O.; SOUZA, H. M. Uso profilático do antibiótico em cirurgia de vias biliares. **Rev. Med. Paraná**, v. 44, n. 3/4, p. 45-48, jul./dez. 1986.

BRISMAR, B.; JALAKAS, K.; MALMBORG, A. S.; STRANDBERG, Å. The significance of bacteriological findings at cholecystectomy. **Acta Chir. Scand.**, suppl. 530, p. 35-38, 1986.

BROOK, I. Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease. **J.Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 10, p. 2373-2375, out. 1989.

BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 10, p. 4801-4805, oct, 1978.

BULAJIĆ, M.; ŠTIMEC, B.; MILIĆEVIĆ, M.; LOEHR, M.; BORIČIĆ, I.; KOVAČEVIĆ, N.; BULAJIĆ, M. Detection of *Helicobacter pylori* genetic material in bile samples by PCR method. **Arch. Gastroenterohepatol.**, v. 20, n. 3-4, 2001.

BULAJIĆ, M.; STIMEC, B.; MILICEVIC, M.; LOEHR, M.; MUELLER, P.; BORICIC, I.; KOVACEVIC, N.; BULAJIC, M. Modalities of testing *Helicobacter pylori* in patients with nonmalignant bile duct diseases. **World J. Gastroenterol.**, v. 8, n. 2, p. 301-304, abr. 2002.

CALLAN, A. M. Culture reports on bile and biliary drainage: A comparative analysis. **J. Am. M. Technol.** v. 5, n. 45, 1939.

CARRAPA, A.; ZÃO, A.; COELHO, J.; SANTOS, J.; PEDROSA, S. Técnicas de análise de DNA aplicadas a diagnóstico. **Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Departamento de Biologia Celular e Molecular.** Porto, abr. 2005.

CHA, J. S.; LEE, H. J.; PARK, I. S. Clinical analysis of the bactibilia. **J. Korean Surg. Soc.**, v. 45, n.1, p. 73-82, jul. 1993

CHAITIN, H. Bacteriology of calculous cholecystitis. **Int. Surg.**, v. 58, n. 3, p. 169-170, mar. 1973.

CHANG, W-T.; LEE, K-T.; CHUANG, S-C.; WANG, S-N.; KUO, K-K.; CHEN, J-S.; SHEEN, P-C. The impact of prophylactic antibiotics on postoperative infection complication in elective laparoscopic cholecystectomy: a prospective randomized study. **Amer. J. Surg.**, v.191, p. 721-725, 2006.

CHETLIN, S. H.; ELLIOT, D. W. Biliary Bacteremia. **Arch. Surg.**, v. 102, p. 303-307, abr. 1971.

CHETLIN, S. H.; ELLIOT, D. W. Preoperative Antibiotics in Biliary Surgery. **Arch. Surg.**, v. 107, p. 319-323, ago. 1973.

CHIQUET, C.; LINA, G.; BENITO, Y.; CORNUT P. L.; ETIENNE, J.; ROMANET, J. P.; DENIS, P.; VANDENESCH, F. Polymerase chain reaction identification in aqueous humor of patients with postoperative endophthalmitis. **J. Cataract. Refract. Surg.**, v.33, n. 4, p. 635-641, abr. 2007.

CICERO, L. A.; VALDÉS, F.J.A.; DECANINI, M. A.; GOLFFIER, R.C.; CICERO, L. C.; CERVANTES, C. J.; ROJAS, R. G. Factores que predicen la conversión de la colecistectomía laparoscópica: Cinco años de experiencia en el Centro Médico ABC. **Rev. Mex. Cir. Endoscop.**, v. 6, n. 2, p. 66-73, 2005.

CLAESSON, B.; HOLMLUND, D.; MÄTZSCH, T. Biliary microflora in acute cholecystitis and the clinical implications. **Acta Chir. Scand.**, v.150, p.229-237, 1984.

COELHO, J. C. U. Litíase vesicular e colecistite. In: _____. Aparelho digestivo: clínica e cirurgia. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1996. cap. 114. p. 1293-1306.

CORLESS, C. E.; GUIVER, M.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; KACZMARSKI, E. B.; FOX, A. J. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. **J. Clin. Microbiol.**, p. 1747-1752, mai. 2000.

COX, J. L.; HELFRICH, L. R.; PASS, H. I.; OSTERHAUT, S. The relationship between biliary tract infections and postoperative complications. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 146, n. 2, p. 233-236, 1978.

COX, T. M. Mendel and his legacy. **Q. J. Med.**, v. 92, p. 183-186, 1999.

CSENDES, A.; BURDILES, P.; MALUENDA, F.; DIAZ, J. C.; CSENDES, P.; MITRU, N. Simultaneous bacteriologic assessment of bile from gallbladder and common bile duct in control subjects and patients with gallstones and common dsct Stones. **Arch. Surg.**, v. 131, p. 389-394, abr. 1996.

CSENDES, A.; FERNANDEZ, M.; URIBE, P. Bacteriology of the gallbladder bile in normal subjects. **Amer. J. Surg.**, v. 129, p. 629-631, jun. 1975.

CURSONS, R. T. M.; JEYERAJAH, E.; SLEIGH, J. W. The use of polimerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. **Crit. Care Med.**, v. 27, n. 5, p. 937-940, mai. 1999.

CUTTING, K. F.; HARDING, K.G. Criteria for identifying wound infection. **J. Wound Care**, v. 3, n.4, p. 198-201, 1994.

CUTTING, K. F.; WHITE, R. J. Revisión de criterios para la identificación de infecciones em heridas. Criteria for identifying wound infection - Revisited. **Gerokomos**, v. 17, n.1, p. 39-47, 2006.

DE, U. Evolution of cholecystectomy: A tribute to Carl August Langenbuch. **Indian J. Surg.**, v. 66, n. 2, p. 97-100, 2003.

DELIKARIS, P. G.; MICHAEL, P. O.; KLONIS, G. D.; HARITOPOULOS, N. C.; GOLEMATIS, B. C.; DREILING, D. A. Biliary bacteriology based on intraoperative bile cultures. **Amer. J. Gastroenterol.**, v. 68, n. 1, p. 51-55, 1977.

DROSTEN, C.; PANNING, M.; GUENTHER, S.; SCHMITZ, H. False-negative results of PCR assay with plasma of patients with severe viral hemorrhagic fever. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4394-4395, nov., 2002.

DYE, M.; MACDONALD, A.; SMITH, G.; The bacterial flora of the biliary tract and liver in man. **Br. J. Surg.**, v. 65, p. 285-287, 1978.

EDLUND, Y. A.; MOLLSTEDT, B. O.; OUCHTERLONY Ö. Bacteriological investigation of the biliary system and liver in biliary tract disease correlated to clinical data and microstructure of the gallbladder and liver. **Acta Chir. Scand.**, n. 116, p. 461-476, 1958/1959.

EÇA, L. P. M. Principais eventos da história da biologia molecular. In: _____. *Biologia Molecular: guia prático e didático*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. B p.15-19.

ELKELES, G.; MIRIZZI, P.L. A study of the bacteriology of the common bile duct in comparison with the other extrahepatic segments of the biliary tract. **Ann. Surg.**, v. 116, n. 3, p. 360-366, set. 1942.

ENGLAND, D. M.; ROSENBLATT, JON. E. Anaerobes in human biliary tracts. **J. Clin. Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 494-498, nov. 1977.

FARSHAD, S.; ALBORZI, A.; MALAKHOSSEINI, S. A.; GRAMIZADEH, B.; OBOODI, B.; KALANI, M. Detection of *Helicobacter* DNA in bile samples of patients with biliary diseases living in south of Iran. **Iran J. Med. Sci.**, v. 31, n. 4, p. 186-190, dez. 2006.

FENOLLAR, F.; ROUX, V.; STEIN, A.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infection. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n. 3, p. 1018-1028, mar. 2006.

FERREIRA, L. C.; Determinação da translocação bacteriana durante colonoscopia mediante hemocultura e PCR. 63 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

FLEMMING, R. J.; FLINT, L. M.; OSTERHOUT, S.; SHINGLETON, W. W. Bacteriologic studies of biliary tract infection. **Ann. Surg.**, v. 166, n. 4, p. 563-570, out. 1967.

FLORES, C.; MAGUILNIK, I.; HADLICH, E.; GOLDANI, L. Z. Microbiology of choledochal bile in patients with choledocholithiasis admitted to a tertiary hospital. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 333-336, 2003.

FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; SHEN, Z.; FENG, Y.; TAYLOR, N. S.; PASTER, B. J.; ERICSON, R. L.; LAU, C. N.; CORREA, P.; ARAYA, J. C.; ROA, I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from chileans with chronic cholecystitis. **Gastroenterology**, v. 114, p. 755-763, 1998.

FOX, J. G.; YAN, L. L.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; SHAMES, B.; MURPHY, J. C.; HAYWARD, A.; BELCHER, J. C.; MENDES, E. N. *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 445-454, fev. 1995.

FRANÇA, P. H. C. Seqüenciamento, clonagem, e expressão em *Escherichia coli* do gene codificante para a DNA polimerase I (*Taq Pol I*) de *Thermus aquaticus*. 140 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 1998.

FRANKLIN, C. L.; BECKWITH, C. S.; LIVINGSTON, R. S.; RILEY, L. K.; GIBSON, S. V.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; HOOK JR., R. R. Isolation of a novel *Helicobacter* species, *Helicobacter cholecystus* sp. nov., from the gallbladders of Syrian hamsters with cholangiofibrosis and centrilobular pancreatitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 12, p. 2952-2958, dez. 1996.

FUKUNAGA, F. H. Gallbladder bacteriology, histology, and gallstones. **Arch. Surg.**, v. 106, p. 169-171, fev. 1973.

GALLAGHER, P.; OSTICK, G.; JONES, D.; SCHOFIELD, P. F.; TWEEDLE, D. E. F. Intraoperative microscopy of bile – is it useful? **Br. J. Surg.**, v. 69, p. 473-474, 1982.

GALILI, O.; ELDAR Jr., S.; MATTER, I.; MADI, H.; BRODSKY, A.; GALIS, I.; ELDAR, S. The effect of bactibilia on the course and outcome of laparoscopic cholecystectomy. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 797-803, 2008.

GARZA-VILLASEÑOR, L. Aspectos históricos de la anatomía quirúrgica de las vías biliares y la colecistectomía. **Rev. Gastroenterol. Mex.**, v. 66, n. 4, p. 210-214, 2001.

GEMBAL, P.; MILIK, K.; ŻDZIEBLO, J.; KĘSIK, J.; ZUBILEWICZ, T. The history of open and laparoscopic cholecystectomy. **Chir. Pol.**, v. 9, n. 2, p. 97-103, 2007.

GLENN, F. Hígado y vías biliares. Anatomía y fisiología Del hígado y vías biliares, y afecciones de la vesícula y conductos biliares. In: _____. Tratado de Patología Quirúrgica. Northwestern: Editorial Interamericana, S.A., 1958, cap. 21, p. 707735.

GOLDMAN, L.; MORGAN, J. A.; KAY, J. Acute cholecystitis - Correlation of bacteriology and mortality. **Gastroenterology**, v. 11, n. 3, p.318-325, set. 1948.

GONÇALVES, A. R. Estudo epidemiológico de *Helicobacter pylori* em pacientes consecutivamente submetidos a esofagogastroduodenoscopia normal. 96f. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.

GORDON-TAYLOR, G.; WHITBY, L. E. H. A bacteriological study of fifty cases of cholecystectomy with special reference to anaerobic infections. **Br. J. Surg.**, v.18, n. 69, p. 78-83, 1930.

GOSWITZ, J. T. Bacteria and biliary tract disease. **Amer. J. Surg.**, v. 128, p. 644-646, nov. 1974.

GRANDE, M.; TORQUATI, A.; FARINON, A. M. Wound infection after cholecystectomy - Correlation between bacteria in bile and wound infection after operation on the gallbladder for acute and chronic gallstone disease. **Eur. J. Surg.**, v.158, p. 109-112, 1992.

HAMBRAEUS, A.; LAURELL, G.; NYBACKA, O.; WHITE, W. Biliary tract surgery: a bacteriologic and epidemiologic study. **Acta Chir. Scand.**, v. 156, p. 155-162, 1990.

HANGUI, R. M. G.; RÊGO, R. E. C.; DEMARCHI, V. C. A.; TOMASICH, F. D. S.; PACHECO Jr., A. M. Complicações pós-operatórias de colecistectomias – Análise comparativa em relação ao sexo. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 1, p. 57-63, jan/fev, 2004.

HAYAKAWA, E.; EDAMOTO, Y.; SIN, D.; TRAN, H. T. T.; IWAKI, Y.; SATO, Y.; SATA, T.; ABE, K. Detection of TT virus DNA in human bile juice. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 54, p. 127-128, 2001.

HELMSTÄDTER, A. Ether and chemical-contact dissolution of gallstones. **Lancet**, v. 354, p. 1376-1377, 16 out. 1999.

HENRIQUES, A. C.; PEZZOLO, S.; GOMES, M. Colecistectomia videolaparoscópica ambulatorial: estudo de 60 casos. **Arq. Med. ABC**, v. 27, n. 2, p. 6-8, 2002.

HENRIQUES, A. C.; PEZZOLO, S.; GOMES, M.; GODINHO, C. A.; BAGAROLLO, C. A. Colectomia videolaparoscópica ambulatorial. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 28, n. 1, p. 27-29, 2000.

HERMANN, R. E. Cirurgia para colecistites aguda e crônica. In: PITT, H. A. Clínicas Cirúrgicas da América do Norte: Cirurgia biliar. Rio de Janeiro, Interlivros, 1990. v. 6. p. 1333-1345.

HIRAMATSU, K.; HARADA, K.; TSUNEYAMA, K.; SASAKI, M.; FJITA, S.; HASHIMOTO, T.; KANEKO, S.; KOBAYASHI, K.; NAKANUMA, Y. Amplification and sequence analysis of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene in gallbladder bile from patients with primary biliary cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 33, n.1, p. 9-18, jul. 2000.

HO, G. Y.; WINDSOR, H. M. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: polymerase chain reaction tests. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 29, n. 4, p. 903-915, dez. 2000.

HOED, P. T.; BOELHOUWER, R. U.; VEEN, H. F.; HOP, W. C. J.; BRUINING, H. A. Infections and bacteriological data after laparoscopic and open gallbladder surgery. **J. Hosp. Infect.**, v. 39, n. 1, p. 27-37, 1998.

HOROWITZ, M.; TIMM, I. Infecção biliar: estudo bacteriológico e avaliação de dados clinicolaboratoriais. **Rev. AMRIGS.**, v. 35, n. 3, p. 137-140, jul. 1991.

HUSSAIN, M. I.; KHAN, A-F. A. Outcome of laparoscopic cholecystectomy in acute and chronic cholecystitis. **Saudi. Med. J.**, v. 27, n. 5, p. 657-660, 2006.

ISENBERG, J. I. Bacteria in bile. **Gastroenterology**, v. 74, n. 1, p. 155-156, 1978.

JANG, J. S.; KIM, K. H.; YU, J-R.; LEE, S-U. Identification of parasite DNA in common bile duct stones by PCR and DNA sequencing. **Korean J. Parasitol.**, v. 45, n. 4, p. 301-306, dec. 2007.

JÄRVINEN, H. J. Biliary bacteremia at various stages of acute cholecystitis. **Acta Chir. Scand.**, v. 146, p. 427-430, 1980.

JÄRVINEN, H.; RENKONEN, O. V.; PALMU, A. Antibiotics in acute cholecystitis. **Ann. Clin. Res.**, v. 10, p. 247-251, 1978.

KADIR, S.; BAASSIRI, A.; BARTH, K. H.; KAUFMAN, S. L.; CAMERON, J. L.; WHITE, R. I. Percutaneous biliary drainage in the management of biliary sepsis. **AJR**, v. 138, p. 25-29, jan. 1982.

KANE, T. D.; JOHNSON, S. R.; ALEXANDER, J.W. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR. **J. Surg. Res.**, v. 63, p. 59-63, 1996.

KARAHAN, Z. C.; MUMCUOGLU, I.; GURIZ, H.; TAMER, D.; BALABAN, N.; AYSEV, D.; AKAR, N. PCR evaluation of false-positive signals from two automated blood-culture systems. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 53-57, 2006.

KEIGHLEY, M. R. B. Micro-organisms in the bile - A preventable cause of sepsis after biliary surgery. **Ann. R. Coll. Surg. Eng.**, v. 59, p. 328-334, 1977.

KEIGHLEY, M. R. B.; DRYSDALE, R. B.; QUORAISHI, M. B.; BURDON, D. W.; ALEXANDER-WILLIAMS, J. Antibiotic treatment of biliary sepsis. **Surg. Clin. North Am.**, v. 55, n. 6, p. 1379-1389, 1975.

KEIGHLEY, M. R. B.; FLINN, R.; ALEXANDER-WILLIAMS, J. Multivariate analysis of clinical and operative findings associated with biliary sepsis. **Br. J. Surg.**, v. 63, p. 528-531, jul. 1976.

KEIGHLEY, M. R. B.; LISTER, D. M.; JACOBS, S. I.; GILES, G. R. Hazards of surgical treatment due to microorganisms in the bile. **Surgery**, v. 75, n.4, p. 578-583, abr. 1974.

KEIGHLEY, M. R. B.; MCLEISH, A. R.; BISHOP, H. M.; BURDON, D. W.; PATH, M. R. C.; QUORAISHI, A. H.; OATES, G. D.; DORRICOTT, N. J.; WILLIAMS, J. A. Identification of the presence and type of biliary microflora by immediate gram stains. **Surgery**, v. 81, n.4, p. 469-472, abr. 1977.

KIVILUOTO, T.; SIRÉN, J.; LUUKKONEN, P.; KIVILAAKSO, E. Randomised trial of laparoscopic versus open cholecystectomy for acute and gangrenous cholecystitis. **Lancet**, v. 351, p. 321-325, 1998.

KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, U. G. Studies on polynucleotides - Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. **J. Mol. Biol.**, v. 56, p. 341-361, 1971.

LA SCOLA, B.; MICHEL, G.; RAOULT, D. Use of amplification and sequencing of the 16S rRNA gene to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. **CID**, v. 24, p. 1161-1163, 24 jun.1997.

LAKSHMI, V. Culture of body fluids using the Bact/Alert System. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 44-50, abr. 2001.

LEEUWEN, P. A. M.; KEEMAN, J. N.; BUTZELARR, R. M. J.; BOGAARD, E. J. M. Correlation between a positive gallbladder culture and subsequent wound infection after biliary surgery - A retrospective study of 840 patients. **Neth.J. Surg.**, v. 37, n. 6, p. 179-182, 1985.

EONG, R. W. L.; SUNG, J. J. Y. Review article: Helicobacter species and hepatobiliary diseases. **Aliment Pharmacol. Ther.** v. 16, p. 1037-1045, 2002.

LEWIS, R. T.; GOODALL, R. G.; MARIEN, B.; PARK, M.; LLOYD-SMITH, W.; WIEGAND, F. M. Biliary bacteria, antibiotic use, and wound infection in surgery of the gallbladder and common bile duct. **Arch. Surg.**, v. 122, p. 44-47, jan. 1987.

LILLEMOE, K. D. Surgical treatment of biliary tract infections. **Am. Surg.**, v. 66, n. 2, fev. 2000.

LIMA, A. J. A.; FROTA, C. C.; BEZERRA FILHO, J. G.; MOREIRA, J. L. B. Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR). **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 141-145, 2006.

LIN, T.-T.; YEH, C.-T.; WU, C.-S.; LIAW, Y.-F. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, n. 10, p. 2214-2219, out. 1995.

LINHARES, M. M.; PAIVA, V.; CASTELO FILHO, A.; GRANERO, L. C. S.; PEREIRA, C. A.; MACHADO, A. M. O.; GOLDENBERG, A.; MATOS, D. Estudos dos fatores de risco pré-operatórios para bacteriobilia em doentes portadores de colecistite aguda calculosa. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, mar. 2001

LORD, R. V. N.; LING, J. J.; HUGH, T. B.; COLEMAN, M. J.; DOUST, B. D.; NIVISON-SMITH, I. Incidence of deep vein thrombosis after Laparoscopic vs minilaparotomy cholecystectomy. **Arch. Surg.**, v. 133, n. 9, 967-973, set. 1998.

LORENZ, R.; HERMANN, M.; KASSEM, A. M.; LEHN, N.; NEUHAUS, H.; CLASSEN, M. Microbiological examinations and in-vitro testing of different antibiotics in therapeutic endoscopy of the biliary system. **Endoscopy**, v. 30, n. 8, p. 708-712, 1998.

LÖTVEIT, T.; OSNES, M.; AUNE, S. Bacteriological studies of common duct bile in patients with gallstone and juxta-papillary duodenal diverticula. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 1, p.93-95, 1978.

LU, Y.; XIANG, T. H.; SHI, J. S.; ZHANG, B. Y. Bile anaerobic bacteria detection and antibiotic susceptibility in patients with gallstone. **HBPD Int.**, v. 2, n. 3, p. 431-434, ago. 2003.

LUPPINO, R.; SANT'ANNA, A. Aplicações das técnicas de biologia molecular na prática médica. In: MORAES, I. N. Tratado de clínica cirúrgica. Roca, São Paulo, cap.4, p. 23-47, 2005.

LYON, B. B. V. The bacteriology of bile. Obtained by duodenal tube biliary drainage. **J. Lab. & Clin. Med.**, v. 17, p. 583-594, 1932.

MACHADO, R. J. C.; GOFFI, F. S. Bacteriologia da bile em afecções cirúrgicas das vias biliares. **An. Paul. Med. Cir.**, v. 110, n. 4, p. 7-14, 1983.

MACHADO, R. J. C.; GOFFI, F. S. Bacteriologia da bile em afecções litíasicas das vias biliares. Associação clinico-radiológica. **Rev. Col. Brás. Cir.**, v. 11, n. 2, p. 45-51, 1984.

MACLEAN, L. D.; GOLDSTEIN, M.; MACDONALD, J. E.; DEMERS, R. Results of cholecystectomy in 1000 consecutive patients. **Can. J. Surg.**, v. 18, p. 459-468, set. 1975.

MANOLIS, E. N.; FILIPPOU, D. K.; PAPADOPOULOS, V. P.; KAKLAMANOS, I.; KATOSTARAS, T.; CHRISTIANAKIS, E.; BONATSOS, G.; TSAKRIS, A. The culture site of the gallbladder affects recovery of bacteria in symptomatic cholelithiasis. **J. Gastrointest. Liver Dis.**, v. 17, n. 2, p. 179-182, jun. 2008.

MANSFIELD, K. G.; CARVILLE, A.; HEBERT, D.; CHALIFOUX, L.; SHVETZ, D.; LIN, K. C.; TZIPORI, S.; LACKNER, A. A. Localization of persistent *Enterocytozoon bieneusi* infection in normal Rhesus Macaques (*Macaca mulata*) to the hepatobiliary tree. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 8, p. 2336-2338, ago. 1998.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R.; FRANCIS, G.J.; LANGTON, S. R.; GOODWIN, C. S. BLINCOW, E. D. Rapid urease test in management of *Campylobacter pyloridis* – associated gastritis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 82, n. 3, p. 200-210, mar. 1987.

MASON, G. R. Bacteriology and antibiotic selection in biliary tract surgery. **Arch. Surg.**, v. 97, p. 533-537, out. 1968.

MATSUKURA, N.; YOKOMURO, S.; YAMADA, S.; TAJIRI, T.; SUNDU, T.; HADAMA, T.; KAMIYA, S.; NAITO, Z.; FOX, J. G. Association between *Helicobacter bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 93, p. 842-847, jul. 2002.

MEIER, A.; PERSING, D. H.; FINKEN, M.; BÖTTGER, E. C. Elimination of contaminating DNA for a general approach to detection of uncultured pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 3, p. 646-652, mar. 1993.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 15, n. 4, p. 314-319, out. - dez. 2001.

METZKER, M. L.; CASKEY, T. C. Polymerase chain reaction. In: _____. Encyclopedia of medical devices and instrumentation. Hoboken, NJ: Ed. John Webster. 2006. v. 5, p. 380-387. .

MONTEIRO, L.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Evaluation of performances of Three DNA enzyme immunoassays for detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 11, p. 2931-2936, nov. 1997.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULVIHILL S J . Surgical management of gallstone disease and postoperative complications. In: Sleisenger M H, Fordtran J S (eds) Gastrointestinal Disease 6th edn. 1998.W B Saunders Company, Philadelphia, cap. 56, pp 973–984

MYUNG, S.-J.; MYUNG-HWAN, K.; SHIM, K. N. KIM, Y.-S.; K, E. O.; KIM, H.-J.; PARK, E.-T.; YOO, K.-S.; LIM, B.-C.; SEO, D. W.; LEE, S. K.; MIN, Y. I.; KIM, J. Y. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human biliary tree and its association with hepatolithiasis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 45, n. 7, p. 1405-1412, jul. 2000.

NASSIF, P. A. N. Estudo experimental das alterações causadas pela bile humana, cálculos biliares humanos e grampos de titânio na cavidade peritoneal de ratos. 48 f. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.

NERI, V.; MARGIOTTA, M.; FRANCESCO, V.; AMBROSI, A.; VALLE, N.; FERSINI, A.; TARTAGLIA, N.; MINENNA, M. F.; RICCIARDELLI, C.; GIORGIO, F.; PANELLA, C.; IERARDI, E. DNA sequences and proteic antigens of *H. pylori* in cholecystic bile and tissue of patients with gallstones. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 22, n. 8, p. 715-720, set. 2005.

NICKEL, A. C.; JUDD, E. S. Cholecystitis: A bacteriological and experimental study of three hundred surgically resected gallbladders. **Surg. Gynec. & Obst.** v. 50, n. 4, p. 655-662, apr. 1930.

NIELSEN, M. L.; JUSTESEN, T. Susceptibility of the liver and biliary tract to anaerobic infection in extrahepatic biliary tract obstruction - Bacteriological investigations: an experimental study in Rabbits. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 10, p. 769-775, mai.1975.

NIELSEN, M. L.; JUSTESEN, T. Anaerobic and aerobic bacteriological studies in biliary tract disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 5, p. 437-446, 1976.

NIELSEN, M. L.; MOESGAARD, F.; JUSTESEN, T.; SCHEIBEL, J. H.; LINDENBERG, S. Wound sepsis after elective cholecystectomy - Restriction of prophylactic antibiotics to risk groups. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.16, n. 7, p. 937-40, 1981.

NILSSON, H.-O.; TANEERA, J.; CASTEDAL, M.; GLATZ, E.; OLSSON, R.; WADSTRÖM, T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1072-1076, mar. 2000.

NOLTE, F. S.; WILLIAMS, J. M.; JERRIS, R. C.; MORELLO, J. A.; LEITCH, C. D.; MATUSHEK, S.; SCHWABE, L. D.; DORIGAN, F.; KOCKA, F. E. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, n. 3, p. 552-557, mar. 1993.

NOMURA, T.; SHIRAI, Y.; HATAKEYAMA, K. Bacteribilia and Cholangitis After Percutaneous Transhepatic Biliary Drainage for Biliary Obstruction. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 3, p. 542-546, mar. 1999.

OHDAN, H.; OSHIRO, H.; YAMAMOTO, Y.; TANAKA, I.; INAGAKI, K.; SUMIMOTO, K.; HINOI, T. Bacteriological Investigation of Bile in Patients with Cholelithiasis. **Surg. Today**, v. 23, n.5, p. 390-395, 1993.

OLIVEIRA, T. F. Estrutura dos ácidos nucléicos. In: In: EÇA, L. P. M. (Coord.). *Biologia Molecular: guia prático e didático*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. 2. p. 33-40.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB J.** v. 7, p. 113-123, jan. 1993.

PANDINI, H. Manual de exames: Biologia Molecular. Belo Horizonte, 2006-2007, disponível em: www.hermespandini.com.br/images/atualiz_manual_32.pdf

PATEL, M. I.; HARDMAN, D. T.; NICHOLLS, D.; FISHER, C. M.; APPLEBERG, M. The incidence of deep venous thrombosis after laparoscopic cholecystectomy. **Med. J. Aust.**, v. 164, n. 11, p. 652-654, 656, jun. 1996.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Med. Microbiol.**, v. 44, p. 1108-1114, abr. 2007.

PIERSOL, G. M.; BOCKUS, H. L. A study of the bile obtained by nonsurgical biliary drainage with special reference to its bacteriology. **Am. J. Med. Sci.**, v. 165, p. 486-497, 1923.

PINHO, M. Da macroscopia ao material genético: DNA, cromossomos e genes. In: _____. *Biologia molecular do câncer*. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. cap. 1. p. 1-21.

_____. Como são analisados os genes e proteínas. In: _____. cap. 5. p. 55-77.

_____. Produção de proteínas a partir dos genes. In: _____. cap. 3. p. 31-42.

PITT, H. A.; POSTIER, R. G.; CAMERON, J. L. Postoperative T-tube cholangiography: Is antibiotic coverage necessary? **Ann. Surg.**, v. 191, n. 1, p. 30-34, jan. 1980.

PITT, H. A.; POSTIER, R. G.; CAMERON, J. L. Biliary bacteria: Significance and alterations after antibiotic therapy. **Arch. Surg.**, v. 117, p. 445-449, abr. 1982.

PITT, H. A.; POSTIER, R. G.; CAMERON, J. L. Consequences of preoperative cholangitis and its treatment on the outcome of operation for choledocholithiasis. **Surgery**, v. 94, n.3, p. 447-452, set. 1983.

PORTINCASA, P.; MOSCHETTA, A.; PALASCIANO, G. Cholesterol gallstone disease. **Lancet**, v. 368, p. 230-9, julho, 2006.

PYRTEK, L. J.; BARTUS, S. A. An evaluation of antibiotics in biliary tract surgery. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 125, n. 1, p. 101-105, jul. 1967.

QIAN, Q.; TANG, Y. W.; KOLBERT, C. P.; TORGERSON, C. A.; HUGHES, J. G.; VETTER, E. A.; HARMSSEN, W. S.; MONTGOMERY, S. O.; COCKERILL III, F. R.; PERSING, D. H. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S r RNA gene: Evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, p. 3578-3582, oct. 2001.

QUINTERO, G. A. Cirurgia hepatobiliar: historia y perspectiva. **Academia Nacional de Medicina de Colombia**, Bogotá, 2004. Disponível em: http://www.anmdecolombia.org/cir_hepatobiliar.htm. Acessado em: 18/4/2008.

RAIA, A. A., OKUMURA, M. Colecistite aguda. In: ZERBINI, E.J. *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto*. 3. ed. rev. e ampl., Sarvier, São Paulo, cap. 35, p. 420-429, 1974.

RAM, M. D.; GHARAVI, M. A. Biliary infections and the choice of antibiotics. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 62, n. 2, p. 134-138, 1970.

RAMDE, D. Nascimento da Biotecnologia: Utilizando o poder do DNA. **E. Journal U.S.A.**, v. 10, n. 4, p.1-6, out. 2005. Disponível em <http://usinfo.state.gov/journals/ites/1005/ijep/ramde.htm>. Acessado em 16/10/2007.

RENKONEN, H. O. The etiology of cholecystitis. *Ann. Chir. Et. Gynaec. Feminae* v. 49, p. 364-380, 1954.

RERKNIMITR, R.; FOGEL, E. L.; KALAYCI, C.; ESBER, E.; LEHMAN, G. A.; SHERMAN, S. Microbiology of bile in patients with cholangitis or cholestasis with and without plastic biliary endoprosthesis. **Gastrointest. Endosc.**, v. 56, n. 6, p. 885-889, 2002.

RICO, R.C.; LLINARES, J. R. S.; POLO, F. C.; VÁZQUEZ, M. T. P.; ROJAS, J. L.V.; ESTÉVEZ, M. D.; ROSIQUE, A. C.; HEREDIA, J. M. Hallazgos bacteriológicos como factor pronóstico en la evolución de la colecistitis aguda. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.**, v. 76, n. 5, p. 465-470, nov. 1989.

RILEY, L. K.; FRANKLIN, C. L.; HOOK Jr., R. R.; BESCH-WILLIFORD, C. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme alalyses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 942-946, apr. 1996.

RODICIO, M. R.; MENDOZA, M. C. Indentificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 4, p. 238-245, 2004.

ROS, A.; GUSTAFSSON, L.; KROOK, H.; NORDGREN, C. E.; THORELL, Q.; WALLIN, G.; NILSSON, E. Laparoscopic cholecystectomy versus mini-laparotomy cholecystectomy: a prospective, randomized, single-blind study. **Ann. Surg.**, v. 234, n. 6, p. 741-749, 2001.

ROSENOW, E. C. The etiology of cholecystitis and gallstones and their production by the intravenous injection of bacteria. **Jour. Infect. Dis.**, , v. 19, p. 527-556, 1916.

RUDI, J.; RUDY, A.; MAIWALD, M.; STREMMEL, W. *Helicobacter* sp. are not detectable in bile from German patients with biliary disease. **Gastroenterology**, v. 116, n. 4, p. 1016-1017, 1999.

SACCHI, C. T.; WHITNEY, Q. M.; MAYER, L. W.; MOREY, R.; STEIGERWAIT, A.; BORAS, A.; WEYANT, R. S.; POPOVIC, T. Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for identification of *Bacillus anthracis*. **Emerg. Infect. Dis.**,v.8, n. 10, p. 1117-1123, out. 2002.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 20 dez. 1985.

SANTOS, J. S.; SILVA, M. B.; ZAMPAR, A. G.; SANKARANKUTY, A. K.; CAMPOS, A. D.; CENEVIVA, R. Mutirões de colecistectomia por videolaparoscopia em regime de cirurgia ambulatorial. **Acta Cir. Bras.**, v. 16, supl. 1, 2001.

SCHIRMER, B. D.; WINTERS, K. L.; EDLICH, R. F. Cholelithiasis and cholecystitis. **J. Long. Term. Eff. Med. Implants.**, v. 15, n. 3, p. 329-338, 2005.

SCHÖNHUBER, W.; LE BOURHIS, G.; TREMBLAY, J.; AMANN, R.; KULAKAUSKAS, S. Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. **BMC Microbiology**, v. 1, n. 20, 2001.

SCHOTTENFELD, L. E. Anaerobic infection of the biliary tract. A review and analysis of thirteen cases from the literature with the addition of eight new cases. **Surgery**, v. 27, n. 5, p. 701-719, may, 1950.

SCHWARTZ, S. I. Gallbladder and extrahepatic biliary system. In: _____. Principles of surgery. Tokyo: Tosho, 1969. cap. 30. p. 1077-1111.

SCOTT, A. J. Progress report. Bacteria and disease of the biliary tract. *Gut*, v. 12, p. 487-492, 1971.

SCOTT, A. J.; KHAN, G. A. Origin of bacteria in bile. **Lancet**, v.2, n.7520, p. 790-792, out. 1967.

SHEEN-CHEN, S.-M.; CHEN, W.-J.; ENG, H.-L.; SHEEN, C.-W.; CHOU, F.-F.; CHENG, Y.-F.; LEE, T.-Y. Bacteriology and antimicrobial choice in hepatolithiasis. **A. J. I. C.**, v. 28, n. 4, p. 298-301, ago. 2000.

SHIMADA, K.; INAMATSU, T.; YAMASHIRO, M. Anaerobic bacteria in biliary disease in elderly patients. **J. Infect. Dis.**, v. 135, n. 5, p. 850-854, mai. 1977.

SILVA, C. H. P. M. Utilização do sistema automatizado BacT/Alert® para o cultivo de fluidos biológicos não sangüíneos. **RBAC**, v. 32, n. 1, p. 35-37, 2000.

SILVA, C. P. Presença do gênero *Helicobacter* na bile e vesícula biliar humana e sua relação com colelitíase. 65. f. Dissertação (Mestrado em Hepatologia) - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas, Porto Alegre, 2003.

SILVA, N. P. Noções básicas de biologia molecular. In: EÇA, L. P. M. (Coord.). *Biologia Molecular: guia prático e didático*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. cap. A p.1-13.

STEWART, L.; GRIFISS, J. McL. ; JARVIS, G. A.; WAY, L. W. Biliary bacterial factors determine the path of gallstone formation. **Am. J. Surg.**, v. 192, p. 598-603, ago. 2006.

STONE, A. M.; TUCCI, V. J.; ISENBERG, H. D.; WISE, L. Wound infection. Acute versus chronic cholecystitis. **Am. J. Surg.**, v. 133, p. 285-288, mar. 1977.

STORK, G.; CABO, A.; SANTIAGO, R.; MAÑANES, G.; MILSTEIN, J. Colecistectomia laparoscópica: resultados obtenidos a 20 años de su descripción em um hospital público. **RC AMBB**, v. 16, n. 2, p. 36-40, abr.-jun. 2006.

SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, A.; OHTO, M.; TSUCHIYA, Y.; SAISHO, H.; KIMURA, K.; ONO, T.; OKUDA, K. Bacteriological study of transhepatically aspirated bile. **Dig. Dis. Sci.**, v. 29, n. 2, p. 109-115, fev. 1984.

SWIDSINSKI, A.; KHILKIN, M.; PAHLIG, H.; SWIDSINSKI, S.; PRIEM, F. Time dependent changes in the concentration and type of bacterial sequences found in cholesterol gallstones. **HEPATOLOGY**, v. 27, n. 3, p. 662-665, mar. 1998.

TABATA, M.; NAKAYAMA, F. Bacteria and gallstones - Etiological significance. **Dig. Dis. Sci.**, v. 26, n. 3, p. 218-224, mar. 1981.

TELÓ, E. P.; MACHADO, A. B. M. P.; SCHIMITT V. M.; CHESKY, M. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de pcr "semi-nested" para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. **RBAC**, v. 39, n.3, p. 197-200, 2007.

THORPE, T. C.; WILSON, M. L.; TURNER, J. E.; DiGUISEPPI, J. L.; WILLERT, M.; MIRRETT, S.; RELLER, L. B. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. **J. Clin. Microbial.**, v. 28, n. 7, p. 1608-1612, jul. 1990.

THORSNESS, E. T. Bacteriology of cholecystitis: The virulence and spore formation of *Clostridium welchii*. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 59, p. 752-755, 1934.

TISELIUS, A.; KABAT, E. A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. **J. Ex. Med.**, v. 69, p. 119-131, jan. 1939.

TOCCHI, A.; LEPRE, L.; COSTA, G.; LIOTTA, G.; MAZZONI, G.; MAGGLIONI, F. The need for antibiotic prophylaxis in elective laparoscopic cholecystectomy. **Arch. Surg.**, v. 135, p. 67-70, jan. 2000.

TONETO, M. G.; MOHR, C. C.; LOPES, M. H. I. Das grandes incisões cirúrgicas à colecistectomia laparoscópica: uma reflexão sobre o impacto de novas tecnologias. **Scientia Medica**, v. 17, n. 1, p. 31-35, jan./mar. 2007.

TRAMPUZ, A.; PIPER, K. E.; STECKELBERG, J. M.; PATEL, R. Effect of gamma irradiation on viability and DNA of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 9, p. 1271-1275, sep. 2006.

TRINDADE, M. R. M.; TRINDADE, E. N.; BOZA, J. C. Manejo da colelitíase no paciente diabético na era da videolaparoscopia. **Rev. Bras. Videocir.**, v. 2, n. 3, p. 161-165, 2004.

TRUEDSON, H.; ELMROS, T.; HOLM, S. The incidence of bacteria in gallbladder bile at acute and elective cholecystectomy. **Acta Chir. Scand.**, v. 149, p. 307-313, 1983.

TWISS, J. R.; CARTER, R. F. ; FISHMAN, B. S. Infection in chronic cholecystitis. Review of two hundred fifty-nine operative cases with preoperative and postoperative duodenal drainage studies. **JAMA**, v. 147, n. 13, p. 1226-1231, nov. 1951.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistemas de Bibliotecas. Referências. 2 ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007 (Normas para apresentação de documentos científicos, 9v.).

VASCONCELLOS, D. Colelitíase. In: _____. Gastroenterologia Prática. São Paulo: Sarvier, 1970. Cap. 1, p. 331-343.

VERMA, G. R.; PANDEY, A. K.; BOSE, S. M.; PRASAD, R. Study os serum calcium and trace elements in chronic cholelithiasis. *ANZ J. Surg.* v. 72, p. 596-599, 2002.

WALLING, A. D. Laparoscopic cholecystectomy in geriatric patients. **Am. J. Surg.**, v. 187, p. 747-750, jun. 2004.

WESTPHAL, J.-F.; BROGARD, J.-M. Biliary tract infections: A guide drug treatment. **Drugs**, v. 57, n. 1, p. 81-91, jan. 1999.

WETTER, L. A.; HAMADEH, R. M. Differences in outer membrane characteristics between gallstone associated bacteria and normal bacterial flora. **Lancet**, v. 343, p. 444-448, 1994.

WILKIE, A. L. The bacteriology of cholecystitis: A clinical and experimental study. **Br. J. Surg.**, v. 15, p. 450-460, 1928.

WILLIS, R. G.; LAWSON, W. C.; HOARE, E. M.; KINGSTON, R. D.; SYKES, P. A. Are bile bacteria relevant to septic complications following biliary surgery?. **Br. J. Surg.**, v. 71, n. 11, p. 845-848, nov. 1984.

WOLLOCH, Y.; FEIGENBERG, Z.; ZER, M.; DINTSMAN, M. The Influence of Biliary Infection on the Postoperative Course After Biliary Tract Surgery. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 67, n. 5, p. 456-462, mai. 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, n. 2, p. 221-271, jun. 1987.

YAMADA, S.; SUNDU, T.; MATSUKURA, N. Detection of *Helicobacter bilis* in bile from Thai patients with adenocarcinoma of biliary tract. **Thai J. Surg.**, v. 24, n. 2, p. 39-44, abr. - jun. 2003.

APÊNDICES

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| APÊNDICE 1 | PLANILHA GERAL DO ESTUDO | 108 |
| APÊNDICE 2 | CONSENTIMENTO INFORMADO | 110 |
| APÊNDICE 3 | PROTOCOLO DE ANESTESIA GERAL PELO SERVIÇO DE ANESTESIOLOGIA DE JOINVILLE - SAJ | 111 |
| APÊNDICE 4 | PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE COLECISTECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA | 113 |
| APÊNDICE 5 | PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE CULTURA AUTOMATIZADA PELO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED – CHU | 114 |
| APÊNDICE 6 | PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO PELO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE | 117 |
| APÊNDICE 7 | PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR PELO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE | 119 |
| APÊNDICE 8 | PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PROCESSO DE ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE PELO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE | 120 |

APÊNDICE 1 - PLANILHA GERAL DO ESTUDO

| IDENTIFICAÇÃO | IDADE | SEXO | TEMPO CIRÚRGICO (MINUTOS) | ANATOMIA PATOLÓGICA | CULTURA BACT/ALERT | BACTERIOS-COPIA | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR |
|---------------|-------|------|---------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------------------------|
| 1 | 30 | F | 37 | CCC | POSITIVO | E. coli | POSITIVO |
| 2 | 60 | M | 42 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 3 | 56 | M | 81 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 4 | 64 | M | 65 | CCC | POSITIVO | Klebsiella | POSITIVO |
| 5 | 50 | F | 69 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 6 | 39 | F | 35 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 7 | 46 | F | 35 | CCC | POSITIVO | Streptococcus | POSITIVO |
| 8 | 32 | F | 65 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 9 | 45 | F | 55 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 10 | 57 | M | 45 | CCC | POSITIVO | E. coli | NEGATIVO |
| 11 | 32 | F | 45 | CCC | POSITIVO | Pseudomonas | NEGATIVO |
| 12 | 47 | F | 50 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 13 | 73 | F | 67 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | E. coli | NEGATIVO |
| 14 | 13 | F | 101 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 15 | 60 | F | 95 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 16 | 54 | F | 88 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 17 | 30 | F | 54 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 18 | 42 | F | 100 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 19 | 34 | F | 100 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 20 | 75 | M | 105 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | Klebsiella, E. coli | POSITIVO |
| 21 | 33 | M | 38 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 22 | 61 | F | 86 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 23 | 68 | F | 86 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 24 | 50 | F | 90 | CCC AGUDIZADA | NEGAV | | POSITIVO |
| 25 | 40 | F | 40 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 26 | 34 | F | 62 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 27 | 40 | M | 65 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 28 | 40 | F | 77 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 29 | 54 | F | 71 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 30 | 57 | F | 32 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 31 | 36 | F | 35 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 32 | 34 | F | 42 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 33 | 43 | M | 40 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 34 | 61 | M | 40 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | Enterobacter | NEGATIVO |
| 35 | 38 | M | 40 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 36 | 48 | F | 55 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 37 | 65 | M | 65 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 38 | 42 | F | 92 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 39 | 42 | M | 45 | CCC | POSITIVO | Klebsiella | POSITIVO |
| 40 | 55 | M | 35 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 41 | 65 | F | 40 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 42 | 43 | F | 60 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 43 | 38 | F | 65 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 44 | 33 | F | 75 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 45. | 40 | F | 75 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

| IDENTIFICAÇÃO | IDADE | SEXO | TEMPO CIRÚRGICO (MINUTOS) | ANATOMIA PATOLÓGICA | CULTURA BACT/ALERT | BACTERIOS-COPIA | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR |
|---------------|-------|------|---------------------------|---------------------|--------------------|-----------------|--------------------------------------|
| 46 | 28 | F | 57 | CCC | NEGATIVO | Staphylococcus | NEGATIVO |
| 47 | 33 | F | 100 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 48 | 45 | M | 98 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 49 | 71 | F | 43 | CCC | POSITIVO | | NEGATIVO |
| 50 | 48 | F | 44 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 51 | 48 | F | 57 | CCC | NEGATIVO | Staphylococcus | POSITIVO |
| 52 | 52 | F | 68 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | | POSITIVO |
| 53 | 25 | F | 89 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 54 | 45 | F | 36 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 55 | 37 | M | 56 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 56 | 60 | F | 66 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | Staphylococcus | POSITIVO |
| 57 | 46 | F | 32 | CCC | POSITIVO | | NEGATIVO |
| 58 | 65 | F | 35 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 59 | 56 | F | 99 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 60 | 41 | F | 95 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 61 | 60 | F | 44 | CCC | NEGATIVO | E. coli | NEGATIVO |
| 62 | 27 | F | 45 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 63 | 40 | F | 50 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 64 | 22 | F | 50 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 65 | 56 | F | 45 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 66 | 60 | F | 40 | CCC | NEGATIVO | Klebsiella | POSITIVO |
| 67 | 30 | F | 35 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 68 | 38 | F | 85 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 69 | 20 | F | 75 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 70 | 32 | F | 60 | CCC | POSITIVO | | POSITIVO |
| 71 | 34 | F | 90 | CCC | NEGATIVO | Staphylococcus | POSITIVO |
| 72 | 55 | F | 65 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 73 | 61 | F | 65 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 74 | 60 | F | 45 | CCC | POSITIVO | | POSITIVO |
| 75 | 56 | F | 49 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 76 | 49 | F | 55 | CCC | NEGATIVO | Pseudomonas | NEGATIVO |
| 77 | 41 | F | 65 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 78 | 44 | F | 65 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 79 | 54 | F | 100 | CCC | NEGATIVO | | NEGATIVO |
| 80 | 74 | F | 45 | CCC | NEGATIVO | | POSITIVO |
| 81 | 29 | F | 55 | CCC | NEGATIVO | Staphylococcus | POSITIVO |
| 82 | 73 | M | 65 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | | NEGATIVO |
| 83 | 88 | M | 35 | CCC AGUDIZADA | POSITIVO | | POSITIVO |
| 84 | 58 | F | 35 | CCC AGUDIZADA | NEGATIVO | Pseudomonas | POSITIVO |

NOTA: Números em vermelho = idade igual ou maior que 60 anos; M = masculino; F = feminino;
 CCC= colecistite crônica calculosa

FONTE: O autor (2008)

APÊNDICE 2 - CONSENTIMENTO INFORMADO

CONSENTIMENTO INFORMADO

A bile é um líquido amarelo e viscoso e tem como principal função a de auxiliar na digestão de gorduras dos alimentos.

Ela é produzida no fígado e através de pequenos canais, desemboca no duodeno.

A vesícula biliar possui a simples função de armazenar a bile, que é liberada para o duodeno nos casos de ingestão de alimentos muito gordurosos.

De uma forma geral, a bile é estéril, isto é, sem bactérias, todavia a presença de cálculos no seu interior ou infecção deste órgão podem predispor à colonização da bile.

Vários métodos de cultura da bile tem sido utilizados para identificar bactérias, mais recentemente a Biologia Molecular, através de exames de DNA, também tem auxiliado neste diagnóstico.

Eu, declaro para os devidos fins que aceitei participar do trabalho científico intitulado: “ **VALOR DA PESQUISA DE DNA BACTERIANO NA BILE HUMANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) EM PACIENTES SUBMETIDOS A COLECISTECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA**”, doando a bile da minha vesícula biliar, após a sua completa retirada, devido a presença de cálculos no seu interior. Autorizo também, a realização de métodos laboratoriais de identificação de bactéria ou o seu material genético na bile, desde que sem custos financeiros, danos físicos ou morais para com a minha pessoa.

.....
(ASSINATURA DO/A PACIENTE)

.....
(LOCAL E DATA)

.....
(DR RICARDO LEMOS)

APÊNDICE 3 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE ANESTESIA GERAL PELO SERVIÇO DE ANESTESIOLOGIA DE JOINVILLE - SAJ

Conforme protocolo do Serviço de Anestesiologia de Joinville, segue a descrição da rotina anestésica para anestesia geral no procedimento de colecistectomia videolaparoscópica.

Na sala de pré-operatório, os pacientes foram medicados com Midazolam (Dorminid®, Roche) 7,5mg via oral com 10 ml de água filtrada aproximadamente 40 minutos antes da cirurgia.

Acesso venoso periférico com cateter nº 20 (Abocath – BD INSYTE™) e início da hidratação com Solução de Ringer com Lactato (Ecoflec® Plus – B/BRAUN)

Na sala operatória realizou-se a monitorização cardíaca, eletrocardiograma contínuo, oximetria de pulso, análise de gases (O₂, N₂O, gás anestésico), capnografia, função neuromuscular, temperatura e monitorização da função cerebral para avaliação do nível de consciência através do aparelho BIS (BIS™ XP MONITOR MODEL A - 2000, Aspect Medical Systems).

A anestesia geral foi realizada com Aparelho de Anestesia Datex-Ohmed S/5 Aespire com Monitor Cardíaco Cardicap IM/5 e Ventilador 7100 (Datex-Ohmed, Inc. , Madison, WI – USA).

Na pré-oxigenação utilizou-se O₂ a 100% de 3 a 5 minutos, indução anestésica com hipnótico: Propofol (Lipuro® 1%, B/Braum) 2mg/Kg/peso, opióide: Citrato de Fentanila (Fentanest® 0,0785mg/ml, Cristália) 5mg/Kg/peso, relaxante muscular: Besilato de Cisatracúrio (Nimbiun® 10mg/5ml, Glaxo) 0,15mg/Kg/peso, além de Sevoflurano 2% (Sevorane® 1ml/ml, Abbott) e oxigênio.

Intubação orotraqueal.

Administração de antibioticoterapia profilática com Cefazolina Sódica (Kefazol®, 1g, ABL)

Manutenção anestésica com Sevoflurano e oxigênio.

Administração de medicações complementares como os antieméticos: Cloridrato de Ondasetrona (Vonau® 4mg/2ml, Biolab Sanus Farmacêutica Ltda) 100mcg/Kg/peso e Fosfato Dissódico de Dexametazona (Decadron® 4mg/ml, Aché) 150mcg/Kg/peso) além de antiinflamatórios e analgésicos: Cetoprofeno

(Cetoprofeno® 100mg, Eurofarma) 1mg/Kg/peso e Dipirona Sódica (Novalgina® 500mg/ml, Aventis) 20mg/Kg/peso)

Ao término da cirurgia extubação orotraqueal e encaminhamento para a sala de recuperação pós-anestésica, com monitorização contínua até sua alta para o setor.

APÊNDICE 4 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE COLECISTECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA

Utilizou-se Aparelho de Videolaparoscopia Storz (Karlstorz – Endoscope : Themoflator – 264320 20, Xenon 300 – 201331 20, *Telecam* SL NTSC – 202121 20, telecan C NTSC – 202121 34, Monitor Sony – PVM 20N6V)

A cirurgia iniciou-se com uma incisão peri-umbelical de aproximadamente 3-4 cm, dissecação da aponeurose, tração superior da mesma com duas pinças de *Bachaus*, com posterior introdução de agulha de *Verres* para confecção do pneumoperitônio com CO₂, insuflação esta que ao atingir níveis de aproximadamente 1 litro e pressão aproximada de 12 mmhg retirou-se a agulha e introduziu-se o primeiro trocater de 12mm (Endopath XCEL, Ethicon®) para ser utilizado pela ótica de 30º.

Sob visão direta, após incisão da pele com aproximadamente 2 cm de extensão, introduziu-se *trocater*s de 5mm de diâmetro (*trocater*s permanentes) na linha axilar anterior e região subcostal na linha claviclar média, respectivamente para a tração da vesícula biliar e auxílio na dissecação da mesma. Na região sub-xifoidéia, realizou-se incisão de 2-3 cm e introduziu-se o *trocater* de 12 mm (Endopath XCEL, Ethicon®) para dissecação da vesícula biliar.

Após inspeção da cavidade abdominal realizou-se a punção da vesícula biliar com a própria agulha de *Verres* que entrava na cavidade abdominal ao lado do trocater de 5mm da linha hemiclavicular. Em alguns casos optou-se por aspiração da bile no final da cirurgia, no momento de tração da mesma até a parede abdominal ou ainda após a sua completa retirada da cavidade abdominal.

Após aspiração da bile iniciou-se a dissecação do hilo da vesícula biliar com identificação minuciosa dos seus elementos com posterior clipagem da artéria cística e do ducto cístico.

A dissecação da vesícula foi realizada com utilização de pinça especial tipo “*ganchinho ou hook*” associado ao eletrocautério. Esta dissecação foi do tipo retrógrada até a total retirada da vesícula do seu leito hepático.

Revisada então a hemostasia, retirou-se a vesícula pela incisão do *trocater* de 12mm peri-umbelical.

APÊNDICE 5 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE CULTURA AUTOMATIZADA PELO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO CENTRO HOSPITALAR UNIMED - CHE

A pesquisa da presença de bactérias através de cultura foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do CENTRO HOSPITALAR UNIMED - CHU, em Joinville – SC.

O meio de cultivo utilizado para a realização das culturas de Bile, foi o Aerobic Blood Culture Media ou BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), sem inibidor de antibióticos, comercializado em frascos estéreis, descartáveis, e identificados com um código de barras que, além do meio de cultivo, possuem em seu interior um sensor colorimétrico de cor verde que tem sua cor alterada na presença de Dióxido de Carbono, produzido pelo crescimento bacteriano.

A formulação do meio consiste da digestão pancreática da caseína, da digestão da soja pela papaina, do polianeto sulfonato de sódio, do hidrocloreto de piridoxina e de outros complexos de aminoácidos e substratos de carboidratos em água purificada, preparada em uma atmosfera de CO₂ no oxigênio sob vácuo.

As amostras de bile, ao serem coletadas, foram encaminhadas imediatamente ao laboratório em frascos estéreis não sendo necessário refrigerá-los.

Antes do manuseio dos frascos (BacT/ALERT® SA), estes foram examinados com o intuito de observar indícios de danos ou deterioração do meio de cultura (descoloração). O meio de cultura contido nos frascos, para estarem nas condições adequadas, devem estar límpidos, sem opalescência, turbidez ou excesso de pressão gasosa, que são possíveis sinais de contaminação.

Após examinar os frascos, realizou-se a identificação do mesmo com os dados do paciente e em seguida, procedeu-se a inoculação de 10 ml da amostra, com seringa e agulhas estéreis, removendo a tampa plástica do mesmo e desinfecção do septo de borracha com algodão embebido em álcool 70%.

A inoculação no frasco com meio de cultura foi realizado sob técnica asséptica e em câmara de fluxo laminar.

Após inoculação da amostra no frasco o mesmo foi homogeneizado manualmente.

Os frascos, após a inoculação, foram incubados e processados automaticamente no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), durante 05 dias a 37°C.

Este equipamento, com capacidade de incubação simultânea para 120 frascos, realiza leituras automáticas, em intervalos de 10 minutos, nos sensores de todos os frascos verificando se houve mudança de cor nos mesmos, o que indica crescimento bacteriano.

Após 05 dias de incubação, caso não fosse detectada a produção de Dióxido de Carbono no interior dos frascos de cultura, o equipamento BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) produzia, em sua tela, um aviso de que no seu interior havia um frasco de cultura Negativo. Os técnicos do laboratório acessavam o programa do equipamento com uma senha específica e selecionavam o comando de “Garrafas Negativas”. Ao abrir a porta do gabinete de incubação do equipamento BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá) uma luz verde acende-se ao lado do frasco indicando que aquele frasco não teve crescimento bacteriano.

O frasco foi retirado, e através da leitura de seu código de barras, identificado o paciente do qual foi colhida aquela amostra. Após estes procedimentos o resultado do exame de cultura para bile foi reportado como Negativo.

Se durante os 05 dias de incubação houvesse crescimento bacteriano, o sensor permeável a gases existentes no fundo do frasco alterava sua cor de azul esverdeado para amarelo, o que era detectado pelo BacT/ALERT® SA Biomérieux (Organon Teknika, Scarborough, Ontário, Canadá), o qual emitia sinal sonoro e aviso na tela do equipamento de que havia um frasco Positivo dentro do equipamento. O processo de retirada do frasco da incubadora foi semelhante ao descrito acima para os frascos Negativos.

Nas amostras positivas foram realizados testes microbiológicos para identificação do microorganismo e sensibilidade destes aos antibióticos (antibiograma).

O processo de identificação e antibiograma iniciou-se a partir da retirada do material de dentro do frasco de cultura positivo, mediante desinfecção da tampa do frasco, homogeneização do mesmo e punção com agulha e seringa estéreis de 01 ml de amostra.

A amostra retirada do frasco foi então semeada nos meios de cultura Agar Sangue de Carneiro, para crescimento de organismos gram positivos e Agar MacConkey, para isolamento de gram negativos.

As placas foram incubadas a 37°C em tensão normal de oxigênio durante 24 horas, e após o crescimento das colônias, foram realizadas as provas de identificação com base nas características de crescimento macroscópico.

As provas de identificação basearam-se em reações bioquímicas de motilidade, produção de gás, oxidação/redução de açúcares, crescimento em meios específicos, hidrólises enzimáticas dentre outras.

Para os testes de sensibilidade aos antibióticos, foi preparada a partir das colônias da placa do meio de cultura, suspensão de bactérias em solução salina que foi inoculada no meio de cultura Muller-Hinton, com posterior adição de discos impregnados com antibióticos em concentrações padronizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA), os antibióticos testados dependiam também da padronização do CLSI para o perfil bacteriano em questão. A placa de Muller-Hinton foi incubada por 24 horas a 37°C em tensão de oxigênio.

Após as 24 horas de incubação foi realizada a medição dos halos de inibição/resistência da bactéria em relação aos antibióticos testados, e determinou-se se o organismo foi resistente, tem resistência intermediária ou foi sensível aos antibióticos conforme comparação entre as medidas dos halos e a padronização do CLSI.

APÊNDICE 6 - PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO PELO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE

Extração/Purificação de DNA Genômico

Método Fenol/Clorofórmio

Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE

Responsável: _____

Data: _____

Projeto (SIGLA): _____

Amostras:

—

Nome do arquivo da foto da eletroforese: _____

Amb = temperatura ambiente / Empregar máscara nas ações marcadas com números vermelhos.

| Ação | V (μL) | T(°C) | t | Rot(rpm) | Visto |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|----------|----------|-------|
| 1. Coletar a amostra de sangue com micropipeta automática de 200 μL, Pipetman® F(Gilson, Middleton, EUA) e ponteiras com filtro, em microtubo de 1,5ml. | 100ul | 37º | 18 a 24h | 13000 | |
| 2. Adicionar Tampão de de extração 10mM Tris pH 7,4; 10mM NaCl; 25mM EDTA(Invitrogen, Carlsbad, EUA); 1% Dodecil Sulfato de Sódio, (UltraPure™Sodium Dodecyl Sulfate, Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 20 μmg/ml de Proteinase K, (<i>Protein kinases</i> , Invitrogen, Carlsbad, EUA). | 400ul | | | | |
| 3. Incubar as amostras | | | | | |
| 4. Adicionar com micropipeta automática de 1000 μL, Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA), volume igual de Fenol neutralizado (UltraPure™ Phenol, Invitrogen, Carlsbad, EUA). | 500ml | | | | |
| 5. Agitar levemente por no agitador Vortex Genie 2 (Scientific,NY, EUA), | | | | | |
| 6. Centrifugar na microcentrifuga (Eppendorf AG, <i>Centrifuge</i> 5415 R,Hamburgo, Alemanha) | | | | | |
| 7. Recolher a fase aquosa com micropipeta automática de 1000 μL,Pipetman® F (Gilson, Middleton, EUA) | ~500ml | | 10 min | | |
| 8. Transferir a fase aquosa para um microtubo de 1,5ml | | | 10 min | | |
| 9. Adicionar com micropipeta automática de 1000 μL, Pipetman® F (Gilson,Middleton, EUA) o mesmo volume de solução de Fenol e Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1) (UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1), Invitrogen, Carlsbad, EUA).. | ~500ml | | | | |

| | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------|----------|--------|-------|
| 10. Repetir passos 5,6, 7 e 8 | 500ml | | | | |
| 11. Adicionar igual volume de clorofórmio (Labsynth, Diadema, Brasil) e álcool isoamílico (LabMaster, Curitiba, Brasil). | | | | | |
| 12. Repetir passos 5,6, 7 e 8 | | | | | |
| 13. Adicionar 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M, pH 5,2 (LabMaster, Curitiba, Brasil). | 50ml | 4º | | | |
| 14. Adicionar 2 vezes o volume de Etanol (F. Maia Indústria e Comércio, Cotia, São Paulo, Brasil) 100% gelado com micropipeta automática de 1000 µL, Pipetman® F (Gilson, Inc. Middleton, EUA). | 1000ml | | | | |
| 15. Incubar as amostras para precipitação do DNA. | | | | | |
| 16. Centrifugar na microcentrifuga (Eppendorf AG, <i>Centrifuge</i> 5415 R, Hamburgo, Alemanha) | 500 | -20º | 18 a 24h | 10 min | 13000 |
| 17. Adicionar Etanol 70%. | | | | | |
| 18. Centrifugar na microcentrifuga (Eppendorf AG, <i>Centrifuge</i> 5415 R, Hamburgo, Alemanha) | | | | | |
| 19. Descartar o sobrenadante | 25ml | Amb. | 2h | | 1300 |
| 20. Repetir passos 17,18 e 19 | | | | | |
| 21. Secar o DNA | | | | | |
| 22. Eluir o DNA em TE (10mM Tris-HCL, 10µM EDTA; pH 8,0), (Invitrogen, Carlsbad, EUA). | 25ml | | | | |
| 33. Utilizar o material extraído logo em seguida ou manter os tubos a -20°C. | | | | | |

Observações: Todas as amostras deverão ser identificadas com marcação no próprio tubo.

APÊNDICE 7 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO MÉTODO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR PELO LABORATÓRIO DE BILOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

As reações de PCR usadas para a amplificação da seqüência correspondente ao RNA ribossomal subunidade 16s do gene, foram realizadas no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, EUA), nas seguintes condições:

10X Ne Buffer (5mM KCl, 1Mm Tris-HCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂), 1,5mMMgCl₂, 0,2mM dNTP's, 20 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores

Com1 (5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3') e Com2 (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3'). 1U de *Platinum Taq DNA polimerase*, (Invitrogen, Carlsbad, EUA). 5U da enzima de restrição *Alu I* (New England BioLabs, Massachusetts, EUA).

A reação foi incubada a 37°C por 2 horas para a digestão completa de possíveis DNAs contaminantes na reação, e inativada por 20 minutos a 65°C.

Após, acrescentou-se 3,0µl de DNA a ser amplificado.

A ativação da enzima *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) ocorreu a 94°C por 3 minutos e a amplificação ocorreu em 35 ciclos, onde cada ciclo consistia de: desnaturação: 1 minuto a 94°C; anelamento: 1 minuto a 55°C e extensão: 1 minuto e 30 segundos a 72°C, seguidos de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

APÊNDICE 8 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PROCESSO DE ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE PELO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA UNIVILLE

ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE

1. Preparação do gel de agarose a 1 %:

| | |
|--------------------|---------------|
| Agarose | 1,5 g |
| TBE 1X novo | 150 ml |

* Usado TBE 1X novo para fazer o gel

** Usado TBE 1X usado na cuba

- Misturado e fundido no microondas por 1,20 minutos (colocado primeiramente por 30 segundos, após isso homogenizado; colocado novamente e deixado mais 20 segundos. Homogenizado novamente; repetido esses passos mais 3x deixando agora 10 segundos) utilizado vidraria própria
- Montado cuba com suportes, limpando-os com H₂O destilada e seco com papel macio.
- Esperado esfriar o gel até temperatura aproximada de 60°C e adicionado 3 µl de **Brometo de etídio (estoque a 10 µg/ml)** e homogenizado levemente evitando a formação de bolhas.

Cuidado: O BROMETO DE ETÍDIO É CANCERÍGENO

- Aplicado a mistura na cuba evitando a formação de bolhas, em seguida aplicado o pente.
- Após a polimerização (± 10 minutos), retirado o pente, colocado o suporte na cuba e coberto o gel com TBE 1X até formar uma película por sobre o mesmo.
- Diluido as amostras em tampão de amostra^{obs1} (*Loading Buffer* 2X ou 6X) e aplicado no gel, não esquecendo o padrão de peso molecular
- Corrido a 100 V por aproximadamente 1 hora. A leitura foi realizada em transiluminador Ultra- Violeta e a imagem foi capturada pela câmera digital.

Obs1 – Distribuir o tampão e as amostras em *parafilm*, homogeinizando bem.

ANEXO

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA



Joinville, 26 de novembro de 2007

Ref. CEP Nº 07022

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

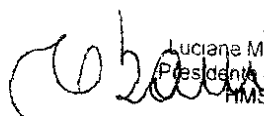
Prezado Dr. Ricardo Lemos

O protocolo de estudo clínico intitulado VALOR DA PESQUISA DE DNA BACTERIANO NA BILE HUMANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) EM PACIENTES SUBMETIDOS A COLECISTECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA, que será conduzido no Centro Cirúrgico da Centro Hospitalar Unimed sob a responsabilidade do Dr. Ricardo Lemos foi avaliado por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerado APROVADO.

Para tal aprovação foram seguidas as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto foram devidamente enfatizados itens que correspondem aos objetivos do estudo e seu racional; antecedentes científicos justificáveis, adequação ao material e método; análise criteriosa dos riscos e benefícios; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do Estudo, bem como a possibilidade de interrupção do estudo nos casos em que se verifiquem riscos aos voluntários.

Também foi analisado e considerado aprovado o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão original de , uma vez que seguem os padrões normativos.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 251/97, a Comissão de Ética em Pesquisa deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento desta Comissão. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo. Solicitamos que este CEP seja informado quando da inclusão do primeiro paciente.


Luciane M. Deboni
Presidente da C.E.P.
HMSJ

Dra. Luciane Mônica Deboni

Presidente do CEP